



**PARHAITEN SOLUVILJELYÄ
TEHOSTAVAN REAGENSIN
LÖYTÄMINEN ERI VALMISTAJIEN
HIIREN ALKION IHON
FIBROBLASTISOLUISTA,
MITOMYSIINI C:STÄ JA
FIBROBLASTI-KASVUTEKIJÖISTÄ**

Taru Hannuksela

Opinnäytetyö
Joulukuu 2013
Laboratorioalan koulutusohjelma

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

HANNUKSELA, TARU:

Parhaiten soluviljelyä tehostavan reagenssin löytäminen eri valmistajien hiiren alkion ihon fibroblastisolusta, mitomysiini C:stä ja fibroblasti-kasvutekijöistä

Opinnäytetyö 70 sivua, joista liitteitä 5 sivua
Joulukuu 2013

Soluteknologia, jossa käytetään uudelleenohjelmoituja kantasoluja eli iPS-soluja (induced Pluripotent Stem cells), on luonut uusia mahdollisuuksia kantasolututkimukseen. iPS-soluteknologian avulla voidaan tuottaa potilasspesifisiä monikykyisiä kantasolulinjoja, joista voidaan tuottaa elimistön eri solutyyppejä. iPS-soluja voidaan ylläpitää erilaisilla viljelymenetelmillä. Hiiren alkion ihon fibroblastisolujen –viljelymallissa, solut kasvavat yhdessä hiiren alkion ihon fibroblastisolujen eli MEF-solujen (Mouse Embryonic Fibroblasts) kanssa. Viljelymallissa MEF-solujen tehtävänä on ylläpitää iPS-solujen pluripotenttisuutta. Ennen kuin MEF-solut voivat ylläpitää iPS-solujen pluripotenttisuutta, tulee ne inaktivoida eli saada jakautumiskyvyttömiksi esimerkiksi mitomysiini C:n avulla. Pluripotenttisuutta ylläpidetään myös fibroblasti-kasvutekijöiden avulla.

Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää eri valmistajien reagensseista parhaiten soluviljelyä tehostavat reagenssit, jotka sopisivat tutkimusryhmän käyttämille solulinjoille. Tutkimuksessa testattiin eri valmistajien MEF-soluja, mitomysiini C:tä ja fibroblasti-kasvutekijää. MEF-solujen ja fibroblasti-kasvutekijän vaikutuksia soluviljelyyn tutkittiin kahden solulinjan avulla. Mitomysiini C:n vaikutuksia tutkittiin inaktivoimattomilla MEF-soluilla. Tutkimuksessa eri tuotteiden vaikutuksia soluviljelyn tehokkuuteen arvioitiin morfologisten ja immunovärijäystulosten perusteella.

Eri valmistajien reagenssit vaikuttivat solulinjoihin hyvin eri tavalla. Saadut tulokset soluviljelyn tehokkuuteen eri valmistajien reagenssien välillä olivat hyvin selkeät. Toiset tuotteet aiheuttivat soluviljelmiin runsaasti erilaistunutta iPS-solukasvustoa ja toiset valmisteet saivat aikaan soluviljelmissä solukolonioiden hyvän kasvun, jossa oli hyvin vähän erilaistunutta solukasvustoa.

Asiasanat: fibroblasti-kasvutekijä, iPS-solu, kantasolu, MEF-solu, mitomysiini C.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

HANNUKSELA, TARU:

How to Find the Best Reagent to Stimulate Cell Culture in Fibroblast Cells, Mitomycin C and Fibroblast Growth Factors Manufactured by Different Companies

Bachelor's thesis 70 pages, appendices 5 pages
December 2013

iPS-technology (induced Pluripotent Stem cells) has created new possibilities for stem cell research. When patient specific stem cell lines are available, all kinds of cells that can be found in human body can be produced. These iPS cells can be maintained in a different kind of cell culture methods. In the culture method where mouse fibroblast cells (MEF-cells) are used, iPS cells are growing with the MEF-cells. These MEF-cells maintain the iPS cells' pluripotency. Before MEF-cells can maintain the pluripotency of iPS cells, they must be inactivated, for example, by mitomycin C. Pluripotency is also maintained with fibroblast growing factors.

The goal of this Bachelor thesis was to find the best product to accelerate cell culture of different companies and to find the product that is suitable for heart group cell lines. Different companies' mouse embryonic fibroblast cells, mitomycin C and fibroblast growth factor were tested. When MEF-cells and fibroblast growth factor were tested two cell lines were used. When mitomycin C was tested, inactivated MEF-cells were used. The results of morphology and immunostaining were used when testing products.

Different kinds of results of the effects of different product on cell culture were achieved. The results were clear, some products caused plenty of differentiated iPS-cell growth and really bad growth in the cell culture some products caused good growth in the cell culture.

Key words: fibroblast growth factor, iPS-cell, stem cell, MEF-cell, mitomycin C

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	8
2.1	Kantasolut	8
2.1.1	Kantasolutyyppit	8
2.1.2	Uudelleenohjelmoidut kantasolut	9
2.2	Kantasolujen kasvatus.....	11
2.2.1	Soluviljely	11
2.2.2	Hiiren alkion ihon fibroblastisolujen -viljelymalli.....	11
2.2.3	Feeder-free -viljelymalli	12
2.3	Immunosytokemiallinen värjäys	13
2.3.1	Vasta-aineet.....	13
2.3.2	Fluoresenssimikroskopia.....	15
2.4	Mitomysiini C	16
2.5	Fibroblasti-kasvutekijä.....	17
3	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS	18
4	TYÖN SUORITUS	19
4.1	Soluviljelyssä käytettävien tuotteiden testaus.....	19
4.1.1	Hiiren alkion ihon fibroblastisolut	19
4.1.2	Mitomysiini C	19
4.1.3	Fibroblasti-kasvutekijä.....	20
4.2	Uudelleenohjelmoidut kantasolulinjat	21
4.3	Kasvatusmediumit.....	21
4.4	Hiiren alkion ihon fibroblastisolut	22
4.4.1	Hiiren alkion ihon fibroblastisolujen viljely	22
4.4.2	Hiiren alkion ihon fibroblastisolujen mitomysiini C käsittely.....	24

4.4.3	Hiiren alkion ihon fibroblastisolujen viljely kuoppalevyille	27
4.5	Uudelleenohjelmoitujen kantasolulinjojen jakaminen hiiren alkion ihon fibroblastisolujen - viljelymallissa	28
4.6	Immunosytokemiallinen värjäys	29
5	TULOKSET	32
5.1	Hiiren alkion ihon fibroblastisolut	32
5.1.1	Morfologiset tulokset	32
5.1.2	Immunovärjäystulokset	39
5.2	Mitomysiini C	44
5.3	Fibroblasti-kasvutekijä.....	48
5.3.1	Morfologiset tulokset	48
5.3.2	Immunovärjäystulokset	54
	POHDINTA	57
	LÄHTEET.....	63
	LIITTEET	66
	Liite 1. Tuotteiden valmistajat.....	66
	Liite 2. Testattavien reagenssien hintaerot.....	67
	Liite 3. Mediumien valmistusohjeet.....	68
	Liite 4. Gelatiinin ja immunovärjäysliuosten valmistusohjeet.....	69

LYHENTEET JA TERMIT

Biopsi	Koepala
Blastokysti	Alkiorakkula
ESC	(Embryonic Stem Cell), alkion kantasolu
FBS	(Fetal Bovine Serum), naudan sikiön seerumi
Feeder-solukerros	Tukisolukko, joka erittää tarvittavia kasvutekijöitä sen kanssa kasvaville soluille
Fenotyyppi	Yksilön ilmiäisy, joka on kaikkien havaittavien ominaisuuksien kokonaisuus
FGF	(Fibroblast Growth Factor), fibroblasti-kasvutekijä
Fluorokromi	Fluoresoiva molekyyli
Gelatiini	Proteiineista koostuva aine
hESC	(human Embryonic Stem Cell), ihmisen alkion kantasolu
Immunoglobuliini	Vasta-aine
<i>in vitro</i>	Elävän organismin ulkopuolella suoritettu koe
iPS-solu	(induced Pluripotent Stem cell), uudelleenohjelmoitu kantasolu
Kantasolu	solu, jolla on rajaton kyky jakautua erilaistumatta ja kyky erilaistua moneksi erilaiseksi tytärsolutyypiksi
MEF-solu	(Mouse Embryonic Fibroblast), hiiren alkion ihon fibroblastisolu
Metabolia	Aineenvaihdunta
Monoklonaalinen vasta-aine	vasta-aine rakentuu yhdestä vasta-aineesta.
Pretanaalinen	Ennen syntymää tapahtuva
Postnataalinen	Syntymän jälkeinen tapahtuma
Polyklonaalinen vasta-aine	Sisältää useampaa vasta-ainetta

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston biolääketieteellisen teknologian yksikön sydänryhmään. Sydänryhmän vetäjänä toimii dosentti, LKT, sisätautien ja kardiologian erikoislääkäri, Katriina Aalto-Setälä. Opinnäytetyön työpaikkaohjaajana toimi laboratorioanalyttikko Henna Venäläinen ja opettajaohjaajana toimi Jaana Renko. Biolääketieteellinen teknologia yksikkö kuuluu osana BioMediTechin yhteisyyksikköä, johon kuuluvat Tampereen yliopisto ja Tampereen teknillinen yliopisto. Sydänryhmän tutkimuksen tavoitteena on erilaistaa toiminnallisia sydänlihassoluja kantasoluista ja hyödyntää geneettisten sydänsairauksien mallinnuksessa iPS-soluteknologiaa.

Kantasolubiologian kehitys on luonut mahdollisuuden kudosuudistuksille, jossa teknologiaa käyttäen voidaan ehkä joskus tulevaisuudessa luoda korvaavaa kudosta sitä tarvitsevalle potilaalle. Ensimmäinen tärkeä askel tämän tavoitteen saavuttamiseen on pluripotenttien kantasolujen tuotanto suoraan potilaasta. Uudelleenohjelmoituja kantasoluja eli iPS-soluja voidaan tuottaa monista ihmisen kudoksista, yleisemmin ihmisen ihon fibroblastisoluista. iPS-soluilla, kuten ihmisen blastokystistä eristetyillä alkion kantasoluilla, on potentiaalia erilaistua lähes kaikiksi elimistön solutyypeiksi eli ne ovat erittäin monikykyisiä kantasoluja (pluripotentteja).

Uudelleenohjelmoituja kantasoluja voidaan kasvattaa hiiren alkion fibroblastisolujen eli MEF-solujen kanssa, joiden tehtävänä on pitää solut pluripotentteina ja erilaistumattomina. MEF-solut erittävät kasvutekijöitä niiden kanssa kasvaville soluille. Ennen kuin MEF-solut voivat ehkäistä soluviljelmässä kasvavien solujen erilaistumista, tulee niiden jakautuminen estää eli ne inaktivoidaan. Inaktivoiminen voidaan tehdä mitomysiini C:n tai γ -säteilytyksen avulla. iPS-solujen pluripotenttisuutta ja erilaistumattomuutta ylläpidetään myös fibroblasti-kasvutekijöiden (FGF) avulla.

Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää eri valmistajien tuotteista parhaiten soluviljelyä tehostavat tuotteet, jotka sopisivat ryhmän käyttämille solulinjoille. Tutkimuksessa testattiin eri valmistajien MEF-soluja, mitomysiini C:tä ja fibroblasti-kasvutekijää.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Kantasolut

Kantasoluilla on kaksi erilaista ominaisuutta, joiden perusteella ne erotetaan erilaistuneesta solusta, esimerkiksi fibroblastisolusta. Kantasoluilla on rajaton kyky jakautua erilaistumatta ja toinen ominaisuus on kyky erilaistua moneksi erilaiseksi tytärsolutyypiksi. (Wang, Trowbridge, Rao, & Orkin 2008, 2.)

Seuraavissa alaotsikoissa tarkastellaan, minkälaisia kantasoluja on olemassa. Lisäksi alaotsikoissa tarkastellaan, missä ihmisen kehityksen vaiheessa erilaisia kantasoluja esiintyy.

2.1.1 Kantasolutyypit

On olemassa totipotentteja, pluripotentteja ja multipotentteja kantasoluja. Totipotentteja eli kaikkikykyisiä kantasoluja esiintyy ainoastaan hedelmöittyneessä munasolussa, joista voi muodostua kokonainen uusi yksilö. Pluripotentteja eli erittäin monikykyisiä kantasoluja saadaan blastokystin sisäsolumassasta. Blastokysti on alkiorakkula, joka on sikiön alkuvaiheessa nisäkkään kohdussa juuri ennen kuin se kiinnittyy kohtuun. Se sisältää ulkoisen kerroksen lisäksi sisäisen solupopulaation eli sisäsolumassan, josta alkio myöhemmin muodostuu. Blastokysti vaiheessa sisäsolumassan solut ovat pluripotentteja kantasoluja. (Mummery, Wilmut, van de Stolpe & Roelen 2011, 293-297.) Myös uudelleenohjelmoidut kantasolut eli iPS-solut (induced Pluripotent Stem cells) ovat pluripotentteja kantasoluja, jotka ovat uudelleenohjelmoitu potilaan somaattisista soluista (Grskovic, Javaherian, Strulovici & Daley 2011, 915). Pluripotentteilla kantasoluilla on kyky jakautua ilman erilaistumista ja siten ylläpitää ja laajentaa kantasolupopulaatiota. Laboratoriossa kasvatetut linjat voivat olla kuolemattomia tämän ominaisuuden vuoksi. (Mummery ym. 2011, 297.)

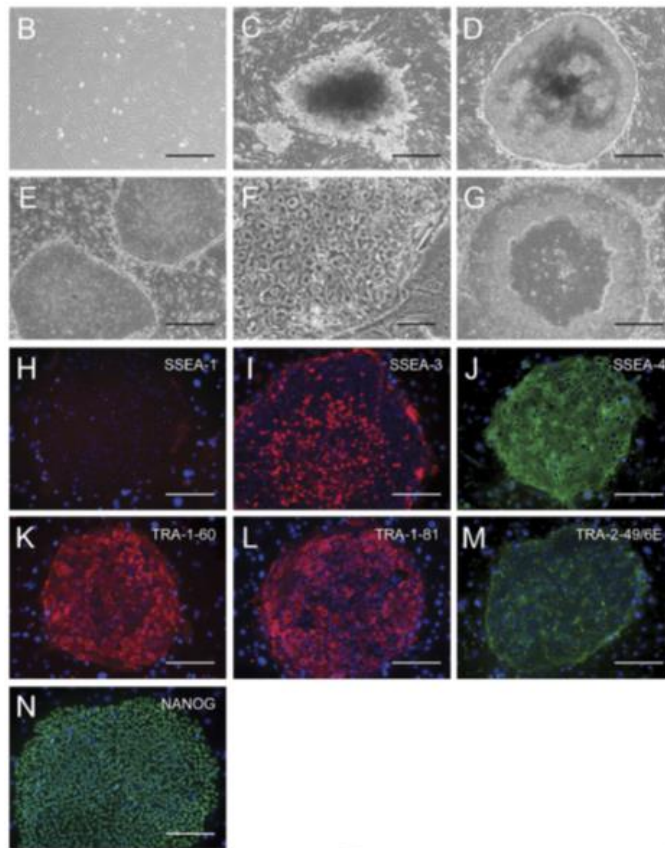
Multipotenteilla eli monikykyisillä kantasoluilla on kyky muodostua moneksi erilaiseksi solutyypiksi, mutta niillä ei ole enää kykyä muodostua kaikiksi solutyypeiksi elimistössä. Aikuisen kantasolut ovat multipotentteja kantasoluja, joita esiintyy organismeissa syntymisen jälkeen ja aikuisessa yksilössä. Veren kantasolut ovat aikuisen kantasoluja, joita esiintyy luuytimessä ja veressä. (Mummery ym. 2011, 293-296).

2.1.2 Uudelleenohjelmoidut kantasolut

Kehittyvä lääketiede eli kantasolu- ja kudosteknologia voivat antaa tulevaisuudessa mahdollisuuden henkilökohtaiseen hoitoon esimerkiksi erilaisissa rappeutumissairauksissa. Ensimmäinen tärkeä askel tämän tavoitteen saavuttamiseen on uudelleenohjelmoitujen kantasolujen tuotanto suoraan potilaasta. Ideana on, että uudelleenohjelmoidut kantasolut voidaan erilaistaa tarvittavaksi solutyypiksi tai kudokseksi ja siirtää tämän jälkeen potilaaseen tai optimoida niiden avulla potilaan lääkehoitoa. (Rodolfa 2008, 1.) iPS-solut antavat myös mahdollisuuden *in vitro* – tautimallinnukseen sekä lääketutkimuksen kehitykseen (Grskovic ym. 2001, 915).

Kun kantasoluja uudelleenohjelmoidaan, potilaan somaattiset solut uudelleenohjelmoidaan pluripotenttiin soluvaiheeseen tarkalleen määritettyjen transkriptiogeneenien avulla (Grskovic, ym. 2011, 915). iPS-soluja on tuotettu monista ihmisen kudoksista. Yleisimmin ihmisen iPS-soluja on tuotettu ihon fibroblastisoluista. Uudelleenohjelmoivia geenejä siirretään yleensä virusvektoreiden avulla soluihin. Uudelleenohjelmointiin tarvitaan ainoastaan neljä eri geeniä, joiden siirtoon käytetään retrovirusta, kuten lentivirusta tai nykyään Sendai-virusta. (Grskovic ym. 2011, 916.) Menetelmissä ihmisen somaattiseen soluun, esimerkiksi ihon fibroblastisoluun, viedään neljä eri geeniä, jotka ovat Oct3/4, Sox2, Klf4 ja c-Myc. Tämän jälkeen solut alkavat ilmentämään näitä geenejä. Nämä neljä geeniä ovat tärkeitä kantasoluille, koska ne ylläpitävät solujen erilaistumattomuutta. (Takahashi, Tanabe, Ohnuki, Narita, Ichisaka, Tomoda & Yamanaka 2007, 834-835.) Erilaistuneet solut muuttuvat virusten vievien tekijöiden vaikutuksesta ja alkavat ilmentämään myös ihmisen alkiosolujen soluspesifisiä antigeenejä, joita ovat SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 ja TRA-2-49/6E ja Nanog ja monia ihmisen pluripotenttien alkion kantasolujen

markkerigeenejä, joita ovat muun muassa OCT3/4 ja SOX2. Näiden markkerigeenien perusteella kantasolut voidaan tunnistaa pluripotenteiksi. (Takahashi ym. 2007, 3.) Kuviossa 1 on kuvia ihmisen ES-soluista ja iPS-soluista, jotka ovat tuotettu ihmisen ihon fibroblastisoluista (DHF, Dhermal Human Fibroblast) (Takahashi ym. 2007, 2).



KUVIO 1. iPS-solut aikuisen ihmisen ihon fibroblastisoluista (DHF). Kuvion ensimmäisessä kohdassa (B) on DHF-solujen morfologia, Kohdassa (C) on yleinen kuva koloniasta, joka ei ole ES-solu, kohdassa (D) on tyypillinen kuva koloniasta, joka on ihmisen ES-solukolonia, kohdassa (E) on kuva iPS-solulinjan morfologiasta, jakonumeron ollessa 6 (klooni 201B7), kohdassa (F) on suurennettu kuva iPS-solukoloniasta, kohdassa (G) on kolonian keskellä spontaanisti erilaistunut alue, kohdissa (H-N) on immunosytokemialliset värjäyskuvat SSEA-1 (H), SSEA-3 (I), SSEA-4 (J), Tra1-60 (K), Tra1-81 (L), Tra1-2-49/6E (M) ja Nanog (N). Tummat on värjätty Hoechst 33342 (sinisellä). Suurennos oli 200 μm kuvissa (B-E, G), 20 μm kuvassa (F) ja 100 μm kuvissa (H-N). (Takahashi ym. 2007, 2, muokattu.)

2.2 Kantasolujen kasvatus

Seuraavissa alaotsikoissa on tarkasteltu kirjallisuudesta löytyvää tietoa siitä, mitä kantasolujen viljely on. Alaotsikoissa on kerrottu kahdesta eri soluviljelymallista, jotka ovat MEF-soluviljelymenetelmä ja feeder-free –viljelymenetelmä eli ilman tukisolukkoa tapahtuva soluviljely.

2.2.1 Soluviljely

Solu- ja kudosviljelymenetelmät kehitettiin 1900-luvun alussa, jolloin tarkoituksena oli tutkia solujen käyttäytymistä. Alunperin tutkijat käyttivät kudosleikkeitä tutkimuksissaan, mutta vähitellen kehitettiin tekniikoita, joiden avulla voitiin tutkia yksittäisen solun käyttäytymistä. Näin kudosviljelyn nimi vaihtui soluviljelyksi. (Coriell Institute for Medical Research 2011, 1.)

Soluviljely sisältää erilaisia soluja keinoekologisessa ympäristössä, jossa soluille tulee olla oikeat ravintoainepitoisuudet, ideaaliset lämpötila-, kosteus- ja ilmakehäolosuhteet sekä soveltuva pinta, jossa solut voivat kasvaa. Soluviljelmiä voidaan valmistaa pienistä koepaloista eli biopseista. Esimerkiksi fibroblastisoluista, jotka on otettu ihobiopsin avulla, voidaan kasvattaa soluja, jotka kasvavat kasvatusliuoksessa eli kasvatusmediumissa. (Coriell Institute for Medical Research 2011, 1.) Soluviljelmiä voidaan ylläpitää monella tavalla, sillä ne voivat kiinnittyä kasvualustan pintaan joko spontaanisti tai mekaanisten tapojen avulla tai kiinnittyä ekstrahuokoiseen kasvupohjan rakenneosaan kuten kollageeniin (Freshey 2006, 4). Kantasolulinjoja voidaan viljellä erilaisten viljelymenetelmien, kuten hiiren alkion ihon fibroblastisolujen viljelymallin tai feeder free –viljelymallin avulla.

2.2.2 Hiiren alkion ihon fibroblastisolujen -viljelymalli

Primaareilla hiiren alkion ihon fibroblastisoluilla eli MEF-soluilla (Mouse Embryonic Fibroblasts) on monia ominaisuuksia, jotka tekevät niistä houkuttelevan

soluviljelymallin. Vastaavasti, kuten muut kudosisviljelyt, ne on helppo perustaa, ylläpitää ja ne kasvavat nopeasti. (Garfield 2010, 19-27.)

Erityisesti alkion kantasoluja kasvatetaan MEF-solujen kanssa, jotka toimivat tarvittavia kasvutekijöitä erittävänä solukerroksena eli ns. feeder-solukerroksena ES-soluille (Mummery ym. 2011, 295). MEF-solujen tehtävänä on pitää kantasolut pluripotentteina ja estää niiden erilaistuminen (Minchiotti ND, 1). Ennen kuin MEF-solut voivat ehkäistä soluviljelmässä kasvavien solujen erilaistumista, tulee ne inaktivoida. Inaktivoinnin jälkeen solut eivät enää jakaudu. Inaktivointiin on kaksi tapaa, jotka ovat γ -säteilytys ja mitomysiini C käsittely. (Conner 2000, 51.)

2.2.3 Feeder-free -viljelymalli

Yleensä ihmisen alkion kantasoluja eli hES-soluja (human Embryonic Stem Cells) on viljelty MEF-solujen kanssa. Kuitenkin tulevaisuuden kliinisissä sovelluksissa hES-soluja tulisi viljellä määritellyissä olosuhteissa, jossa altistus eläinten patogeeneille on ehkäisty. (Amit & Itskovitz-Eldor 2006, 37-49.) Eläinpatogeenit, joita esiintyy eläinperäisen tukisolukossa, voivat siirtyä helposti hES-soluihin, jolloin hES-solut voivat toimia patogeenien kuljettajina. Kun soluja mahdollisesti siirrettäisiin potilaisiin, voisivat patogeenit läpäistä potilaan immuunipuolustuksen. (Noggle, Sato & Brivanlou 2005, 144-146.)

Tämän vuoksi kehitetään erilaisia viljelymenetelmiä hES-soluille, jotka perustuvat seerumin korvaaviin aineisiin ja tukea antavan solukerroksen puuttumiseen. Feeder-free –menetelmässä MEF-solujen toiminnot korvataan mediumilla, jossa on kasvutekijöitä ja viestiaiaineita. (Amit & Itskovitz-Eldor 2006, 37.) Feeder-free kasvatuksessa käytetään yhdistelmäkasvupohjaa esimerkiksi matrigeliä feeder-kerroksen tilalla (Noggle ym. 2005, 144-146). Kyseisen viljelymenetelmän tavoitteena on luoda sovellus hyvin määritetystä viljelysysteemistä ja vähentää solujen altistumista eläinpatogeeneille (Amit, Shakariki, Marqulets & Itskovitz-Eldor 2003, 837-845).

2.3 Immunosytokemiallinen värjäys

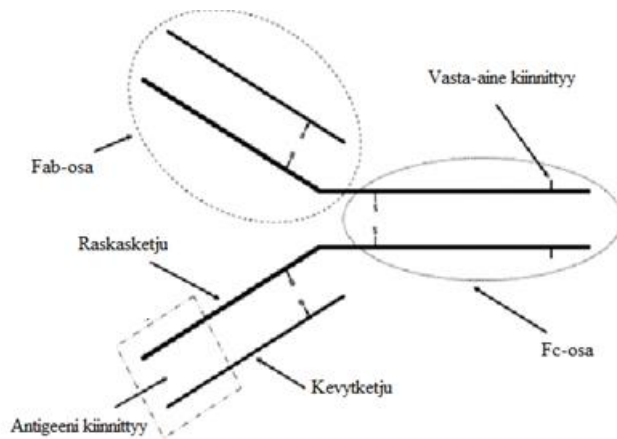
Kuluneiden muutamien vuosikymmenten aikana poly- ja monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö on immunosytokemiallisessa menetelmässä kehittynyt keskeiseksi työvälineeksi tutkimuksellisiin ja diagnostisiin tarkoituksiin *in situ* –soluille (van der Loos 2009, 35). Immunosytokemiallilentekniikka tekee mahdolliseksi vuorovaikutusten määrittämisen kohteiden välillä, kun esimerkiksi halutaan määrittää tiettyjen kohteiden läsnäoloa eri soluissa tai samassa solussa. Immunosytokemian avulla voidaan saada tietoa tietystä kohteesta proteiinitasolla ja DNA/mRNA tasolla. (Christensen & Winther 2009, 103.)

Immunosytokemian perusajatuksena on saada esille soluosista erilaisia antigeenejä niille spesifisten vasta-aineiden avulla. Kun antigeenin ja vasta-aineen kiinnittymistä esiintyy, se nähdään värillisenä kemiallisena reaktiona valomikroskoopin avulla tai fluorokromien eli fluoresoivien molekyylien avulla ultraviolettivalolla. (Ramos-Vara 2005, 405.)

2.3.1 Vasta-aineet

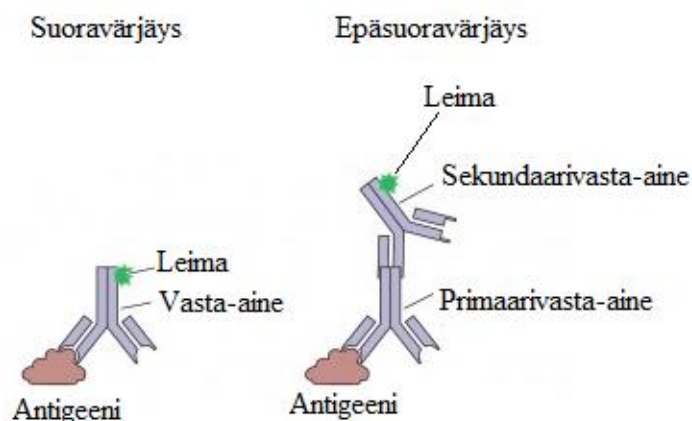
Immunosytokemiassa vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat Y-kirjaimen muotoisia, jotka muodostuvat kahdesta identtisestä kevytketjusta ja kahdesta raskasketjusta. Jokaisessa immunoglobuliinimolekyylissä molemmat kevytketjut ja raskasketjut ovat samantyyppisiä. Kevytketju koostuu kahdesta erilaisesta alueesta, jotka ovat C-terminaalinen puoli ja N-terminaalinen puoli. (Ramos-Vara 2005, 405.)

Vasta-aineen rakenteessa on kaksi osaa: Fab-osa ja Fc-osa. Fab-osan avulla vasta-aine tarttuu antigeeniin. Fab-osa sisältää vaihtelevia ja tasaisia osia raskas- ja kevytketjusta. Fc-osan avulla vasta-aine sitoutuu toiseen vasta-aineeseen. Lisäksi Fc-osa määrittää vasta-aineen biologiset ominaisuudet. (Ramos-Vara 2005, 405-406.) Kuvassa 1 on esitelty immunoglobuliinin rakenne.



KUVA 1. Immunoglobuliinin rakenne (Ramos-Vara 2005, 406, muokattu)

Immunologinen värjäys voi olla suoravärjäys, jossa vasta-aineeseen liitetään suoraan fluoresoiva molekyyli eli fluorokromi tai entsyymi. Yleensä kuitenkin käytetään epäsuoraa värjäystä. Epäsuorassa värjäyksessä primaarivasta-aine kiinnittyy antigeeniin, jonka jälkeen näyte käsitellään sekundaarivasta-aineella, joka kiinnittyy primaarivasta-aineeseen. (Freshney 2005, 278.) Yleensä sekundaarivasta-aineet voidaan entsyymileimata muun muassa alkalisella fosfataasilla, fluoresenssileimauksella (esim. Alexa-Fluor –sekundaarivasta-aineilla) tai konjugoimalla biotiinillä, jonka jälkeen näytettä voidaan tarkastella fluoresenssimikroskoopin avulla. Fluoresenssileimausta käytetään yleensä tuplavärjäyksissä tai moninkertaisissa värjäysmenetelmissä. (IHCWORLD 2011.) Kuviosta 2 nähdään menetelmät, jossa näyte on immunovärjätty suoran ja epäsuoran värjäys-menetelmän avulla.



KUVIO 2. Suora- ja epäsuoravärjäys (Racaniello 2010, muokattu)

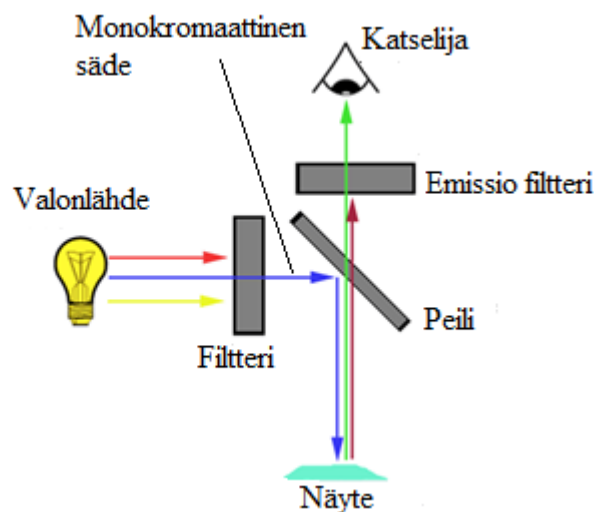
Primaarivasta-aineita valmistetaan rokottamalla eläimiä puhtaalla antigeenillä. Yleensä primaarivasta-aineen tuottamiseen käytetään esimerkiksi hiiriä, jäniksiä, vuohia tai hevosia. Eläin alkaa tuottamaan rokotuksen jälkeen vasta-ainetta antigeenia kohtaan. (Ramos-Vara 2005, 408.) Sekundaarivasta-aineen tulisi olla tuotettu eri eläimessä kuin primaarivasta-aineen (IHCWORLD 2011). Kun esimerkiksi vuohi rokotetaan puhdistetulla hiiressä tuotetulla vasta-aineella, rupeaa vuohi tuottamaan sekundaarivasta-ainetta, joka on vastaan hiiressä tuotettua vasta-ainetta. Tällöin epäsuorassa värjäyksessä vuohessa tuotettu anti-hiiri sekundaarivasta-aine tunnistaa hiiressä tuotetun primaarivasta-aineen ja kiinnittyy sen osiin. Jos sekundaarivasta-aine tuotettaisiin samassa eläimessä kuin primaarivasta-aine, ei spesifistä sitoutumista tapahtuisi. (Thermo Scientific 2013.)

2.3.2 Fluoresenssimikroskopia

Fluoresenssi, josta käytetään myös termiä fosforesenssi, on fysikaalinen ilmiö, jossa tapahtuu valon absorptiota ja siitä seuraavaa uudelleen säteilyä orgaanisesta tai epäorgaanisesta lähteestä. Brittiläinen tutkija George G. Stokes kuvaili ensimmäisenä fluoresenssin vuonna 1852. Hän havaitsi, että kivennäisaine emittoi punaista valoa, kun sitä valaistaan ultraviolettivalolla, joka on virittynyt. Stokes huomasi fluoresenssiemission ilmenevän aina pidemmällä aallonpituudella kuin, mitä virittynyt valo oli. Fluoresenssi-ilmiön havaitseminen johti fluoresenssimikroskoopin luomiseen. (Spring & Davidson 2013, 1.)

1930-luvulla otettiin käyttöön fluorokromit, joilla voidaan värjätä kudოსia, bakteereja ja muita patogeenejä. Fluorokromien käyttö on mahdollistanut hyvin spesifisten, fluoresoimattomien solujen ja solukomponenttien tunnistamisen. (Spring & Davidson 2013, 1.) Fluorokromien läsnäoloa soluissa voidaan tarkastella fluoresenssimikroskoopin avulla (Karp 2005, 737). Fluoresenssimikroskoopista on tullut tärkeä tekninen työkalu biologisissa ja biolääketieteellisissä tutkimuksissa. (Spring & Davidson 2013, 1.)

Fluoresenssimikroskoopin valonlähteenä käytetään ultraviolettivaloa. Fluoresenssimikroskooppi toimii siten, että alussa ultraviolettisäde matkaa mikroskoopin filtterin läpi, jolloin se estää muiden aallonpituuksien läpi pääsyn paitsi sen, joka voi osoittaa fluorokromin läsnäolon. Monokromaattinen säde ohjataan näytteeseen, joka sisältää fluorokromin, jolloin se virittyy ja emittoi valoa näkyvällä aallonpituudella. Näkyvä valo suunnataan objektiivilinsseihin, jolloin katsoja näkee kuvan. Koska valonlähde tuottaa ainoastaan ultraviolettivaloa eli mustaa valoa, fluorokromeilla leimatut näytteet ilmenevät selvästi värillisenä mustaa taustaa vasten luoden korkean kontrastin. (Karp 2005, 737.) Kuvio 3 nähdään fluoresenssimikroskoopin toimintaperiaate.



KUVIO 3. Fluoresenssimikroskoopin toimintaperiaate (John Innes Centre ND, muokattu)

2.4 Mitomysiini C

Mitomysiini C:n avulla inaktivoidaan MEF-soluja. Inaktivoitujen MEF-solujen tehtävänä on ylläpitää niiden kanssa kasvavien kantasolujen, esimerkiksi iPS-solujen, pluripotenttisuutta ja erilaistumattomuutta (Fleischmann, Müller, Blasczyk, Sasaki & Horn 2009, 225). Kun MEF-solut inaktivoidaan mitomysiini C:n avulla, solut ovat käsittelyn jälkeen elinkelpoisia, mutta ne eivät kykene jakautumaan (CytoSpring ND, 1). Inaktivoinnin jälkeen MEF-solujen aineenvaihdunta pysyy aktiivisessa vaiheessa,

jolloin ne kykenee tuottamaan erilaisia kasvutekijöitä, joita niiden kanssa kasvavat kantasolut tarvitsevat pysyäkseen pluripotentteina ja erilaistumattomina (Roy, Krzykwa, Lemieux & Neron 2001, 873).

MEF-solujen inaktivoinnissa mitomysiini C kiinnittyy kovalenttisesti MEF-solun DNA:han, jolloin muodostuu ristiliitoksia. Mitomysiini C inhiboi tällöin DNA:n synteesiä, jolloin solu ei voi jakautua. (Tocris 2012, 1; Sigma-Aldrich 2008, 1.) Tämä vuorovaikutus estää komplementaarisen DNA:n juosteiden erottumisen toisistaan, jolloin se estää DNA:n replikaation (Sigma-Aldrich 2008, 1).

2.5 Fibroblasti-kasvutekijä

Emäksistä fibroblasti-kasvutekijää eli FGF:ä (Fibroblast Growth Factor –Basic) saadaan eristettyä alkioista sen varhaisen kehityksen vaiheessa. FGF ylläpitää alkion kantasolujen pluripotenttisuutta ja kykyä jakautua erilaistumatta. Se tukee solujen jakautumista ja ehkäisee solujen erilaistumista. (Sigma-Aldrich 2013, 1.)

Emäksinen FGF kuuluu yhtenä jäsenenä tunnettuun FGF-perheeseen, joka sisältää yhteensä 23 erilaista FGF:ä. Kyseisen perheen proteiinit ovat tärkeässä roolissa ennen syntymää tapahtuvan eli prenataalisen kehityksen ja syntymän jälkeisen eli postnataalisen kasvun aikana. (PeproTech 2013, 1.) Postnataalisen kasvun aikana FGF-proteiinit ohjaavat muun muassa solujen lisääntymistä, kasvua ja erilaistumista (R&D Systems 2013, 1).

3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää eri valmistajien reagensseista parhaiten soluviljelyä tehostavat reagenssit, jotka sopisivat ryhmän käyttämille solulinjoille. Tutkimuksen tarkoituksena oli testata eri valmistajien inaktivoituja hiiren alkion ihon fibroblastisoluja, mitomysiini C:tä ja fibroblasti-kasvutekijää. Testattavien MEF-solujen valmistajat olivat Millipore, Amsbio ja Cellsystems. Mitomysiini C:n valmistajat olivat Sigma, Santa Cruz ja Tocris ja fibroblasti-kasvutekijän valmistajat R&D Systems ja PeproTech.

Inaktivoituja MEF-soluja ja fibroblasti-kasvutekijän vaikutuksia soluviljelyyn tutkittiin kahden solulinjan avulla, jotka olivat UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT. Mitomysiini C:n vaikutuksia tutkittiin inaktivoimattomilla MEF-soluilla. Tutkimuksessa eri tuotteiden vaikutuksia soluviljelyn tehokkuuteen arvioitiin morfologisten ja immunovärjäystulosten perusteella.

4 TYÖN SUORITUS

Kaikki työmenetelmät ovat peräisin Tampereen yliopiston/IBT/BioMediTechin solu- ja kudosteknologia yksikön sydänryhmän työmenetelmät-kansiosta. Töiden suorituksissa käytettävien tuotteiden valmistajat löytyvät liitteestä 1.

4.1 Soluviljelyssä käytettävien tuotteiden testaus

Opinnäytetyössä testattiin eri valmistajien MEF-soluja, mitomysiini C:tä ja FGF:ä. Seuraavissa alaluvuissa on kuvattu, miten eri tuotteita testattiin ja tutkittiin.

4.1.1 Hiiren alkion ihon fibroblastisolut

MEF-solujen testauksessa vertailtiin kolmen eri valmistajan Milliporen, Amsbion ja Cellsystemsien tuottamia inaktivoituja MEF-soluja. Näitä valmisteita tutkittiin kahdella eri solulinjalla, jotka olivat UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT.

Kahta eri solulinjaa kasvatettiin viiden solujaon ajan eri valmistajien MEF-solujen kanssa. Viiden solujaon ajan tarkasteltiin solulinjojen morfologisia muutoksia, joista otettiin kuvia. Solulinjoista tehtiin värjäysnäytteet solujakonumerojen ollessa 2 ja 5. Morfologisia piirteitä tarkastellessa kiinnitettiin huomiota erilaistuneiden kohtien määrään, kolonioiden tiiviyyteen ja selvärajaisuuteen, kolonioiden kokoon ja määrään ja siihen, kuinka hyvin MEF-solukerros irtosi kaivoilta solulinjoja jaettaessa. Testattujen reagenssien hinnat löytyvät liitteestä 2.

4.1.2 Mitomysiini C

Mitomysiini C testauksessa vertailtiin kolmen eri valmistajan mitomysiini C tuotteita. Valmistajat olivat Sigma, Santa Cruz ja Tocris. Näiden valmistajien mitomysiini C:llä

käsiteltiin inaktivoimattomat MEF-solut, joiden tuloksia vertailtiin kontrollinäytteeseen, jota ei käsitelty mitomysiini C:llä.

Mitomysiini C:n vaikutuksia tutkittiin morfologisten tulosten ja värjäystulosten perusteella. MEF-solut värjättiin Ki-67 primaarivasta-aineella. Ki-67 primaarivasta-aine kiinnittyy jakautuvien solujen tumiin ja sitä ei esiinny lepovaiheessa olevissa soluissa (Kausch, Lingnau, Endl, Sellmann, Deinert, Ratliff, Jocham, Sczakiel, Gerdes & Böhle 2003, 710). Tutkimuksessa itse inaktivoidut MEF-solut viljeltiin kahdelle 12-kuoppalevyille. Kuoppalevyn kaivoista otettiin kuvat kolmantena, seitsemäntenä ja kymmenentenä päivänä. Toinen levyistä fiksattiin neljäntenä päivänä ja toinen levyistä fiksattiin 11.päivänä, jonka jälkeen levyt immunovärjättiin. Kun kuoppalevyistä otettiin kuvat, tarkasteltiin sitä, miltä solut näyttivät, jakautuivatko solut vielä ja oliko kaivoissa paljon kuolleita soluja. Värjäyksien avulla voitiin laskea levyiltä jakautuvien tumien täsmällinen määrä. Testattujen reagenssien hinnat löytyvät liitteestä 2.

4.1.3 Fibroblasti-kasvutekijä

Fibroblasti-kasvutekijä testauksessa vertailtiin kahden eri valmistajan R&D Systemsin ja PeproTechin FGF-tuotteita. Näitä tuotteita tutkittiin kahden eri solulinjan avulla, jotka olivat UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT.

Kahta eri solulinjaa kasvatettiin viiden solujaon ajan eri valmistajien FGF:n kanssa. Viiden solujaon ajan tarkasteltiin solulinjojen morfologisia muutoksia, joista otettiin kuvia. Solulinjoista tehtiin värjäysnäytteet solujakonumerojen ollessa 2 ja 5. Morfologisia piirteitä tarkasteltaessa kiinnitettiin huomiota erilaistuneiden kohtien määrään, kolonioiden tiivyyteen ja selvärajaisuuteen, kolonioiden kokoon ja määrään.

Ensimmäisessä koesarjassa testattiin Milliporeen valmistamien MEF-solujen kanssa molempia FGF-tuotteita omilla kaivoilla. PeproTechin valmistamalla FGF:llä solulinjat pysyivät paremmin erilaistumattomina kuin R&D Systemsin valmistamalla FGF:llä. Koska saadut tulokset olivat niin selkeät, tuotteiden testaamista ei jatkettu enää pidemmälle. Testattujen reagenssien hinnat löytyvät liitteestä 2.

4.2 Uudelleenohjelmoidut kantasolulinjat

Tutkimustöissä käytettiin uudelleenohjelmoituja solulinjoja UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT. Näitä solulinjoja käytettiin, kun testattiin eri valmistajien MEF-soluja ja FGF:ä. Molemmat solulinjat on tuotettu sydänryhmässä kahdesta katekoliamiiniherkkä polymorfinen kammiotakykardia – sydänsairautta (CPVT, Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia) sairastavasta potilaasta. Tämä harvinainen sydämen rytmihäiriösairaus aiheutuu potilaalle sairautta aiheuttavan geenivirheen vuoksi. Geenivirhe voi esiintyä kahdessa geenissä, jotka ovat RYR2 ja CASQ2. (U.S National Library of Medicine 2013.)

4.3 Kasvatusmediumit

MEF-soluille annettiin MEF-mediumia, joka sisälsi KnockOut™ D-MEM eli KO-DMEM –mediumipohjaa, vasikan alkion seerumia eli FBS:a (Fetal Bovine Serum) ja glutamaksia. Koska mediumi ei sisältänyt antibioottia, tuli mediumi steriilisuodattaa ennen käyttöä. MEF-mediumi valmistettiin aina sinä päivänä, kun MEF-soluja maljattiin kasvatusalustoille.

20 % KO-SR KO-DMEM –mediumi (20 % Knock-Out Serum Replacement) eli KSR-mediumi annettiin erilaistumattomille iPS-solulinjoille. Mediumia käytettiin MEF-viljelymenetelmässä solujen ylläpidossa ja pitämään solut erilaistumattomina. Se sisälsi KO-DMEM –mediumipohjaa, seerumin korvaajaa eli KO-SR (Knock-Out Serum Replacement), ei-välttämättömiä aminohappoja eli NEAA (Non-Essential Amino Acids), glutamaksia, penisilliini/ streptomysiini –antibioottia, β -merkaptotetanolia ja FGF:a. FGF tuli lisätä mediumiin juuri ennen käyttöä, jonka jälkeen mediumi oli käyttökelpoinen kolme päivää. KSR-mediumi säilyi kaksi viikkoa jääkaapissa +4 °C:ssa ilman FGF:ä. Mediumia vaihdettiin soluille kolme kertaa viikossa.

Jokainen mediumi lämmitettiin inkubaattorissa +37 °C:een ennen käyttöä. Erikokoisille kuoppalevyn kaivoille annosteltiin eri määrät mediumia taulukon 1 mukaisesti. Liitteestä 3 löytyy kaikkien mediumien valmistusohjeet.

TAULUKKO 1. Mediumimäärät eri kuoppalevyjen kaivoille

Kuoppalevy	Kaivon pinta-ala	Mediumi/kaivo
6-kuoppalevy	9,6 cm ²	2 ml
12-kuoppalevy	3,5 cm ²	1 ml
24-kuoppalevy	1,9 cm ²	0,75 ml

4.4 Hiiren alkion ihon fibroblastisolut

Seuraavissa alaluvuissa on käsitelty, kuinka inaktivoimattomia MEF-soluja viljeltiin viljelypulloihin ja, kuinka MEF-solut inaktivoitiin mitomysiini C käsittelyn avulla. Lisäksi alaluvuissa on käsitelty inaktivoitujen, kuinka inaktivoituja MEF-soluja viljeltiin kuoppalevyille.

4.4.1 Hiiren alkion ihon fibroblastisolujen viljely

Ennen kuin inaktivoimattomia MEF-soluja viljeltiin 175 cm² kokoiseen viljelypulloon, lämmitettiin 40 ml MEF-mediumia tunnin ajan +37 °C:ssa. Viljelypullo pinnoitettiin 0,1 %:lla gelatiinilla tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Gelatiinin valmistusohje löytyy liitteestä 4. Yksi pakastusampulli, joka sisälsi käsittelemättömiä MEF-soluja, sulatettiin +37 °C:en vesiasiassa siten, että vain puolet ampullista upotettiin veteen. Ampullia oli sulatettu tarpeeksi, kun solususpensiosta oli enää vähän jäätyneenä ampullissa. Ennen kuin ampulli siirrettiin laminaarivirtauskaappiin, sen ulkopuoli steriloitiin 70 %:lla etanolilla kontaminaatioiden ehkäisemiseksi. Tämän jälkeen viljelypullosta imettiin gelatiini pois ja tilalle laitettiin 40 ml lämmintä MEF-mediumia. Solususpensio pipetoitiin mediumiin, jonka jälkeen pipetoitiin muutaman kerran ylös ja alas tasaisen solususpension aikaansaamiseksi.

Kun MEF -viljelypullo oli saavuttanut 80 % konfluentin tilan eli viljelypullo oli 80 %:sti täynnä MEF-soluja, solut jaettiin 1:10. Esivalmisteluissa laitettiin työn suorituksen kannalta tarpeellinen määrä MEF-mediumia lämpiämään +37 °C:een tunniksi. Jakoa

varten laitettiin kymmenen 175 cm² kokoista viljelypulloa ja kaksi 75 cm² kokoista viljelypulloa pinnoittamaan 0,1 %:lla gelatiinilla tunniksi huoneenlämpötilaan.

MEF-solujen viljelypullosta imettiin ensimmäisenä mediumi pois kokonaan, jonka jälkeen solut pestiin kaksi kertaa fosfaattipuskuroidulla saliinilla (PBS, Phosphate Buffered Saline). PBS:ä laitettiin kummallakin pesu kerralla 10 ml. Pesujen jälkeen solut käsiteltiin trypsiinillä. Trypsiiniä laitettiin viljelypulloon 5 ml huolellisesti joka puolelle ja annettiin sen vaikuttaa 2-5 minuuttia huoneenlämpötilassa. Trypsiini on endopeptidaasi, joka pilkkoo proteiineja (Medix Laboratoriot 2013, 1; Tohtori 2013, 1). Trypsiinin vaikutuksesta MEF-solut irrottautuivat viljelypullon pohjasta. Trypsiinin päälle lisättiin 17 ml lämmintä MEF-mediumia, jolloin trypsiinin vaikutus lakkasi. Solususpensiota pipetoitiin muutaman kerran ylös ja alas tasaisen solususpension aikaan saamiseksi.

Gelatiini imettiin pois pinnoitetuilta viljelypulloilta. Jokaiseen 175 cm² kokoiseen viljelypulloon lisättiin 31 ml MEF-mediumia ja 75 cm² kokoiseen viljelypulloon lisättiin 15 ml MEF-mediumia. Koska MEF-viljelypullo jaettiin 1:10, 175 cm² kokoiseen viljelypulloon pipetoitiin 2 ml solususpensiota, jotta saatiin oikea määrä MEF-soluja viljelypulloon. Yhtälöiden 1 ja 2 avulla voitiin laskea, kuinka paljon 75 cm² kokoiseen viljelypulloon tuli pipetoida solususpensiota.

$$S = \frac{A1}{A2} \quad (1)$$

S = Pinta-alojen suhdeluku

$A1$ = Pinta-ala, jota verrataan

$A2$ = Pinta-ala, johon verrataan

$$V2 = S \times V1 \quad (2)$$

$V2$ = Tuntematon pipetoitava tilavuus

S = Pinta-alojen suhdeluku

$V1$ = Tunnettu pipetoitava tilavuus

75 cm² kokoiseen viljelypulloon pipetoitiin solususpensiota 0,86 ml. Pipetoitava määrä laskettiin seuraavasti:

$$V2 = (75 \text{ cm}^2 / 175 \text{ cm}^2) * 2 \text{ ml}$$

$$V2 = 0,85714... \text{ ml} \approx 0,86 \text{ ml}$$

MEF-solujen annettiin kasvaa 80 - 90 % konfluenttiin tilaan ennen kuin soluja ruvettiin käsittelemään mitomysiini C:llä.

4.4.2 Hiiren alkion ihon fibroblastisolujen mitomysiini C käsittely

Ensimmäisenä MEF-solujen viljelypulloista poistettiin mediumia siten, että pulloihin jäi mediumia 16 ml, jolloin viljelypulloihin lisättävä mitomysiini C laimeni oikeaan konsentraatioon. Eri valmistajien mitomysiini C käyttöliuosten konsentraatio oli 1,0 mg/ml ja mitomysiini C:n vaikutuskonsentraation tuli olla 10 µl/ml. Pipetoitavan mitomysiini C:n määrä laskettiin käyttämällä yhtälöä 3.

$$C1V1 = C2V2 \quad (3)$$

$C1$ = liuoksen alkukonsentraatio

$V1$ = liuoksen alkutilavuus

$C2$ = liuoksen loppukonsentraatio

$V2$ = liuoksen lopputilavuus

Liuosta, jonka mitomysiini C konsentraatio oli 1 mg/ml, pipetoitiin 160 µl:a 16 ml:an mediumia, jolloin mitomysiini C:n konsentraatio oli 10 µl/ml. Pipetoitava määrä laskettiin seuraavasti:

$$V1 = (C2 \times V2) / C1$$

$$V1 = (10 \text{ µl/ml} \times 16 \text{ ml}) / 1000 \text{ µl/ml}$$

$$V1 = 0,16 \text{ ml} = 160 \text{ µl}$$

Ennen kuin mitomysiini C voitiin lisätä viljelypulloihin, tuli se sulattaa, sillä sitä säilytettiin pakastimessa $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Tocriksen valmistama mitomysiini C sulii helposti ja nopeasti. Myös Santa Cruzin valmistama mitomysiini C sulii aika helposti ja nopeasti, mutta Sigman valmistama mitomysiini C ei sulanut nopeasti ja siihen kului paljon aikaa. Sulatuksen jälkeen mitomysiini C:tä pipetoitiin kaikkiin muihin viljelypulloihin paitsi yhteen 75 cm^2 kokoiseen viljelypulloon, josta tehtiin kontrollinäyte. Yhdeksän 175 cm^2 kokoista viljelypulloa käsiteltiin Sigman valmistamalla mitomysiini C:llä, yksi 175 cm^2 kokoinen viljelypullo käsiteltiin Tocriksen valmistamalla mitomysiini C:llä ja yksi 75 cm^2 kokoinen viljelypullo käsiteltiin Santa Cruzin mitomysiini C:llä. Mitomysiini C lisäysten jälkeen viljelypullot laitettiin inkuboitumaan $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:een kolmeksi tunniksi.

Inkuboinnin jälkeen viljelypulloista poistettiin mediumi kokonaan vaarallisen jätteen pulloon, koska mitomysiini C on myrkyllistä. Solut pestiin kaksi kertaa PBS:llä, jota laitettiin kummallakin pesu kerralla 10 ml. Ensimmäinen pesukerta kerättiin talteen vaaralliseen jätteeseen. Pulloihin lisättiin tämän jälkeen trypsiiniä siten, että 175 cm^2 kokoisiin viljelypulloihin laitettiin 5 ml ja 75 cm^2 kokoisiin viljelypulloihin laitettiin 2,5 ml. Trypsiinin annettiin vaikuttaa 2-5 minuuttia. Kun solut olivat irronneet pohjasta lisättiin trypsiinin päälle MEF-mediumia 5 ml, jotta trypsiinin vaikutus lakkaisi. Trypsiinin päälle lisättiin MEF-mediumia, koska se sisälsi vasikan alkion seerumia eli FBS:a, joka pysäyttää trypsiinin vaikutuksen. Solususpensiot siirrettiin 50 ml falcon-putkiin, jonka jälkeen laskettiin solujen määrä. Solut laskettiin solulasku-kammion avulla, joka sisälsi kaksi kammioita. Kammiot sisälsivät ruudukot, joista laskeminen tapahtui kummankin kammion keskimmäisestä $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ -ruudusta. Yhtälön 4 mukaan laskettiin solususpension solupitoisuus millilitrassa. MEF-soluja kasvatettiin kahdella 12-kuoppalevyllä siten, että jokaisella kaivolla oli 90 000 solua. Yhtälön 5 mukaan laskettiin, kuinka paljon solususpensiota tuli pipetoida 12-kuoppalevyn kaivolle.

$$C(solususpensio) = n(KA) \times 10000 \quad (4)$$

$$V(solususpensio) = \frac{n(haluttu)}{C(suspensio)} \quad (5)$$

$C(solususpensio)$ = solususpension solupitoisuus (solua/ml)

$n(KA)$ = kammiosta laskettujen solujen keskiarvo

$V(solususpensio)$ = tarvittavan solususpension tilavuus, ml

$n(haluttu)$ = haluttu solumäärä

Kun laskettiin Sigman mitomysiini C:llä käsiteltyjä MEF-soluja, saatiin solumääräksi 120 000 solua/ml. Solususpensio laskettiin seuraavasti:

$$C(solususpensio) = 12 \text{ solua/ml} \times 10000$$

$$C(solususpensio) = 120\,000 \text{ solua/ml}$$

Solususpensiota pipetoitiin yhdelle kaivolle 0,75 ml, joka laskettiin seuraavasti:

$$V(solususpensio) = 90\,000 \text{ solua} / 120\,000 \text{ solua/ml}$$

$$V(solususpensio) = 0,75 \text{ ml}$$

MEF-solujen viljelylevyjä tehtiin yhteensä kaksi. Kuitenkaan kaikille valmistajien mitomysiini C käsitellyille MEF-soluille ei saatu kuutta kaivoa, koska solut eivät riittäneet. Taulukosta 2 nähdään, kuinka monta kaivoa eri valmistajille saatiin sekä, mitä laimennossuhteita kokeiltiin värjäysliuos Ki-67:lla. Solut värjättiin Ki-67 vasta-aineella, jotta saatiin selville, kuinka monta jakautuvaa MEF-solua kaivoissa oli. Eri laimennoksia kokeiltiin ainoastaan yhdelle levyille, jonka jälkeen toinen levy värjättiin Ki-67:n laimennoksella, jolla saatiin parhaimmat värjäystulokset. Taulukossa 2 tyhjät ruudut osoittavat käytössä olleen kaivon ja ruutu, jossa on merkintä x, ei ollut käytössä.

TAULUKKO 2. Mitomysiini C käsiteltyjen MEF-solujen viljely 12-kuoppalevyille. Tyhjät ruudut osoittavat käytössä olleen kaivon ja ruutu, jossa on merkintä x, ei ollut käytössä

Ki-67:n laimennossuhde	Kontrolli	Sigma	Santa Cruz	Tocris
1:600			X	
1:800				
1:1000			X	

4.4.3 Hiiren alkion ihon fibroblastisolujen viljely kuoppalevyille

Tavallisesti inaktivoidut MEF-solut viljeltiin 6-kuoppalevyille kaksi päivää ennen solulinjojen jakoa, jonka jälkeen jaetut solulinjat jatkoivat kasvuaan MEF-solujen kanssa. Ennen MEF-solujen sulatusta MEF-mediumi laitettiin lämpiämään +37 °C:een noin tunniksi. Samalla kuoppalevyjen kaivot laitettiin pinnoittumaan huoneenlämpöön tunniksi 0,1 %:lla gelatiinilla.

Nestetyssä säilytettiin pakastusampullia, jossa oli eri valmistajien määrittämä määrä MEF-soluja. Ampullissa oli 1 ml solususpensiota. Sulatus tapahtui siten, että puolet ampullista laitettiin +37 °C:n vesiastiaan. Ampullia oli sulatettu tarpeeksi, kun solususpensiosta oli enää vähän jäätyneenä ampullissa. Ennen kuin ampulli siirrettiin laminaarivirtauskaappiin, sen ulkopuoli steriloitiin 70 %:lla etanolilla, jotta kontaminoitumisia ei tapahtuisi.

Sulatuksen jälkeen ampulliin lisättiin pipetillä noin 1 ml pisara kerrallaan lämmintä MEF-mediumia koko ajan sekoittaen pipetin kärjellä. Lopulta saatu solususpensio pipetoitiin koko MEF-mediumi määrään. MEF-solujen solukonsentraation tuli olla solususpensiossa 0,1 miljoonaa solua/ml. Solususpension solukonsentraatio laskettiin yhtälön 6 mukaan.

$$c = \frac{n}{v} \quad (6)$$

c = Solususpension konsentraatio

n = Solujen lukumäärä

v = mediumin tilavuus

Kun MEF-mediumia valmistettiin 50 ml, mediumiin lisättiin 5 miljoonaa MEF-solua, jolloin solususpension solukonsentraatioksi saatiin 0,1 milj. solua/ml. Lisättävä MEF-solujen määrä laskettiin seuraavasti:

$$0,1 \text{ milj. solua/ml} = x \text{ milj. solua/ml} / 50 \text{ ml}$$

$$x = 0,1 \text{ milj. solua/ml} * 50 \text{ ml}$$

$$x = 5 \text{ milj. solua}$$

Solususpensio voitiin siirtää kuoppalevyjen kaivoille, kun kaivoilta oli poistettu 0,1 %:nen gelatiini. Erikokoisille kuoppalevyn kaivoille annosteltiin eri määrät mediumia taulukon 3 mukaisesti.

TAULUKKO 3. MEF-solususpension määrä eri viljelyalustoille

Viljelyalusta	MEF-solujen määrä milj/kaivo	MEF-solususpension 0,1 milj/ml määrä/kaivo
10 cm viljelypullo	1,55	15,5 ml/kaivo
6-kuoppalevy	0,25	2,5 ml/kaivo
12-kuoppalevy	0,09	0,9 ml/kaivo
24-kuoppalevy	0,05	0,5 ml/kaivo

Kun solut oli pipetoitu levyille, levyjä liikutettiin nopein liikkein sivulta sivulle ja ylhäältä alas, jotta solut levittyivät tasaisesti kaivojen pohjaan. Tämän jälkeen levyt siirrettiin +37 °C:n inkubaattoriin.

4.5 Uudelleenohjelmoitujen kantasolulinjojen jakaminen hiiren alkion ihon fibroblastisolujen -viljelymallissa

Solulinjat UTA.07001.CPVT ja UTA.05404.CPVT jaettiin kerran viikossa, kun kaivot olivat lähes konfluentteja eli kaivot olivat lähes täynnä solukolonioita. Ennen

solulinjojen jakoa tarkastettiin MEF-solujen kunto. MEF-solujen tuli olla kiinnittyneitä kaivojen pohjaan ja ne eivät saaneet jakautua. Tämän jälkeen MEF-levyille vaihdettiin KSR-mediumi noin tuntia ennen solulinjojen jakoa. KSR-mediumia laitettiin tässä vaiheessa 6-kuoppalevyn kaivolle 2,0 ml.

Solujen jako aloitettiin poistamalla MEF-solut kaivoilta ennen kollagenaasi IV käsittelyä. MEF-solut poistettiin siten, että pipetin kärki laitettiin kaivon pohjaan kiinni ja liikutettiin pipetinkärkeä pohjaa pitkin samalla puhaltaen pipetillä. Solukolonioiden tuli jäädä pohjaan kiinni, kun MEF-solut poistettiin niiden ympäriltä.

Kun MEF-solut oli irrotettu pohjasta, imettiin koko mediumi pois kaivosta, jonka jälkeen kaivoon lisättiin 1 ml kollagenaasi IV – liuosta, jonka konsentraatio oli 1 mg/ml. Kaivoa inkuboitin noin 5 minuuttia +37 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen liuos poistettiin kaivosta ja siihen lisättiin 3 ml KSR-mediumia. Solulinjojen solukolonioiden irrotettiin mediumiin pipetillä varovasti puhaltaen. Mediumiin yritettiin irrottaa ainoastaan hyvännäköisiä kolonioita, jotka eivät olleet erilaistuneita. Tässä vaiheessa kolonioiden irrotettiin pitää myös mahdollisimman kokonaisina paloina. Kun kolonioiden oli irrotettu pohjasta, niistä tehtiin asianmukaisen kokoisia paloja pipetoimalla solususpensiota muutaman kerran ylös ja alas. Sen jälkeen sopiva määrä kolonioiden paloja siirrettiin MEF-solujen päälle, jossa oli 2 ml KSR-mediumia. Valmis levy siirrettiin +37 °C:n inkubaattoriin. Levyä liikutettiin nopeilla liikkeillä sivulta sivulle ja ylhäältä alas, jotta kolonioiden palat levittyivät tasaisesti joka puolelle.

4.6 Immunosytokemiallinen värjäys

Ennen värjäystä 12-kuoppalevyjen kaivot tuli fiksata. Fiksaus aloitettiin siten, että ensimmäisenä kaivoilta imettiin mediumi pois. Tämän jälkeen kaivot pestiin kaksi kertaa PBS:llä, jota laitettiin kaivoille 0,75 ml. Kummankin pesukerran tuli kestää 5 minuuttia, jonka jälkeen PBS poistettiin kaivoilta. Pesujen jälkeen kaivoihin lisättiin 0,75 ml 4 % paraformaldehydia eli PFA:ta (paraformaldehyde), jonka annettiin vaikuttaa 20 minuuttia. Sen jälkeen PFA kerättiin talteen kaivoista vaarallisen jätteen pulloon, koska PFA on myrkkö. Kaivot pestiin kaksi kertaa yksinkertaisella PBS:llä,

josta ensimmäinen pesukerta kerättiin talteen. Kun kaivot oli pesty kaksi kertaa PBS:llä, siirryttiin värjäysvaiheeseen.

PBS:n jälkeen solut käsiteltiin blokkauслиuoksella. Blokkauслиuos oli liuos, joka sisälsi 10 % normaalia aasin seerumia (NSD, Normal Donkey Serum), 0,1 % TritonX-100 ja 1 % naudan albumiini seerumia (BSA, Bovine Serum Albumin) PBS-liuoksessa. Blokkauслиoksen annettiin vaikuttaa huoneenlämmössä 45 minuuttia. Tämän jälkeen kaivot pestiin pesuliuoksella, jonka NSD-pitoisuus oli 1 %, TritonX-100 pitoisuus oli 0,1 % ja BSA:n pitoisuus 0,1 % PBS:ssä. Samasta liuoksesta valmistettiin primaarivasta-aineliuos lisäämällä liuokseen oikea määrä primaarivasta-ainetta. Pesun jälkeen 12-kuoppalevyn kaivolle laitettiin primaarivasta-aineliuosta 300 µl ja annettiin sen vaikuttaa yön yli. Oikea primaarivasta-aineliuoksen määrä laskettiin yhtälön 7 avulla.

$$V(\text{primaari vasta - aine}) = V(\text{koko liuos}) \times S \quad (7)$$

$V(\text{primaari vasta-aine})$ = primaari vasta-aineen tilavuus

$V(\text{koko liuos})$ = koko liuoksen tilavuus

S = jakosuhte

Kun esimerkiksi värjättiin Nanog primaarivasta-aineella, pipetoitiin yhdelle 12-kuoppalevyn kaivolle 300 µl primaarivasta-aineliuosta, johon oli primaaria pipetoitu 1,5 µl jakosuhteen ollessa 1:200. Pipetoitava pitoisuus laskettiin seuraavasti:

$$V(\text{primaari vasta-aine}) = 300 \mu\text{l} \times (1:200)$$

$$V(\text{primaari vasta-aine}) = 1,5 \mu\text{l}$$

Kun primaarivasta-aine oli vaikuttanut yön yli, kaivot pestiin kolme kertaa 1%:lla BSA:lla PBS:ssä. Pesuliuoksen annettiin vaikuttaa 5-7 minuuttia. Tämän jälkeen kaivoille laitettiin sekundaarivasta-aineliuos, joka valmistettiin 1 % BSA-liuokseen PBS:ssä. Oikea sekundaarivasta-aineliuoksen määrä laskettiin yhtälön 7 (s. 30) avulla. Liuoksen annettiin vaikuttaa huoneenlämmössä yhden tunnin ajan. Tämän jälkeen kaivot pestiin kolme kertaa yksinkertaisella PBS:llä ja kaksi kertaa fosfaattipuskurilla (PB, Phosphate Buffer). Molempien pesuliuosten annettiin olla kaivoilla 5 minuuttia. Pesujen jälkeen kaivot kuivattiin kunnolla imemällä pesuliuos tarkasti pois. Jokaiseen

kaivoon laitettiin tippa Vectashieldin DAPIa (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride), jonka päälle laitettiin peitinlasi. Sekundaarivasta-aineliuosta käsiteltiin koko ajan valolta suojattuna. Värjäyksen jälkeen 12-kuoppalevyt säilytettiin +4 °C:ssa, jossa ne säilyi yhden viikon ajan. Värjäyksen jälkeen levyt mikroskoipoitiin fluoresenssimikroskoopilla.

Taulukosta 4 löytyy tiedot iPS-solujen värjäyksessä käytettävistä vasta-aineista ja niiden laimennossuhteista, kun kyseessä oli MEF-soluviljelymallilla kasvatetut solut. Taulukosta 5 löytyy tiedot mitomysiini C -käsiteltyjen MEF-solujen värjäyksessä käytettävistä vasta-aineista ja niiden laimennossuhteista. Liitteessä 4 on immunovärjäysliuosten valmistusohjeet.

TAULUKKO 4. iPS-solujen värjäys MEF-soluviljelymallissa

Primaari vasta-aine	Laimennossuhde	Sekundaari vasta-aine	Laimennossuhde
Nanog	1:200	Alexafluor 488 donkey anti-goat IgG	1:800
Oct	1:400	Alexafluor 488 donkey anti-goat IgG	1:800
Tra-1-60, Ki-67	1:200, 1:800	Alexafluor 568 goat anti-mouse IgG, Alexafluor 488 donkey anti-rabbit IgG	1:800, 1:800
Tra-1-81, Ki-67	1:200, 1:800	Alexafluor 568 goat anti-mouse IgG, Alexafluor 488 donkey anti-rabbit IgG	1:800, 1:800
SSEA-4	1:200	Alexafluor 568 goat anti-mouse IgG	1:800
SOX-2	1:200	Alexafluor 488 donkey anti-goat IgG	1:800

TAULUKKO 5. Mitomysiini C käsiteltyjen MEF-solujen värjäys

Primaarivasta-aine	Laimennos-suhteet	Sekundaarivasta-aine	Laimennos-suhde
Ki-67	ensimmäisessä levyssä 1:1000 ja toisessa levyssä 1:600, 1:800 ja 1:1000	Alexafluor 488 donkey anti-rabbit IgG	1:800

5 TULOKSET

5.1 Hiiren alkion ihon fibroblastisolut

Seuraavissa alaluvuissa on tarkasteltu iPS-solulinjojen UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT morfologisia ja immunovärjäystuloksia, kun iPS-solulinjat kasvoivat eri valmistajien MEF-solujen kanssa.

5.1.1 Morfologiset tulokset

Kun solulinjoja UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT kasvatettiin Milliporeen valmistamien MEF-solujen kanssa, kaivoissa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. Kuva erilaistuneesta solukoloniasta on esitetty kuviossa 1 kohdassa G (s. 10). Koloniat eivät olleet selvärajaisia ja tasaisia pinnaltaan. MEF-solukerros oli paksu. Solulinjoja jaettaessa MEF-solut irtosivat helposti kaivon pohjasta, mutta ne ottivat kolonioita mukaansa.

Kun solulinjoja UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT kasvatettiin Amsbion valmistamien MEF-solujen kanssa, koloniat olivat selvärajaisia ja tiiviitä. Kuva selvärajaisesta ja tiiviistä solukoloniasta on esitetty kuviossa 1 kohdassa E (s. 10). Kaivoissa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solukerros oli ohut. Solulinjoja jaettaessa MEF-soluja oli erittäin vaikea irroittaa kaivon pohjasta. MEF-soluja jouduttiin raaputtamaan pipetin kärjellä pois, jolloin kaivoihin jäi MEF-soluja. Koloniat eivät irronneet MEF-solujen mukana.

Kun solulinjoja kasvatettiin Cellsystemsin valmistamien MEF-solujen kanssa, koloniat olivat selvärajaisia ja tiiviitä. Kaivoissa kasvoi vain vähän erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solukerros oli ohuempi kuin Milliporeen MEF-soluilla ja paksumpi kuin Amsbion MEF-soluilla. Solulinjoja jaettaessa jakosuhde oli yleensä molemmilla solulinjoilla 1:7 eli suurin tutkimusryhmän sisällä käytetty jakosuhde. Jaettaessa solulinjoja, MEF-solut irtosivat helposti eivätkä ottaneet kolonioita mukaansa.

Taulukosta 6 löytyy solulinjojen morfologiset tulokset, kun solulinjoja kasvatettiin Milliporeen MEF-solujen kanssa. Solulinjoja tarkasteltiin viidessä eri solujakonumerossa. Taulukossa 7 on esitetty solulinjojen morfologiset tulokset, kun solulinjoja kasvatettiin Amsbion MEF-solujen kanssa. Solulinjoja tarkasteltiin viidessä eri solujakonumerossa. Taulukosta 8 löytyy solulinjojen morfologiset tulokset, kun solulinjoja kasvatettiin Cellsystems MEF-solujen kanssa. Solulinjoja tarkasteltiin viidessä eri solujakonumerossa. Kuvassa 2 on kuvattu solulinjan UTA.05404.CPVT morfologia, kun solulinjaa kasvatettiin Milliporeen, Amsbion ja Cellsystems MEF-solujen kanssa. Kuvassa 3 on puolestaan kuvattu solulinjan UTA.07001.CPVT morfologia, kun solulinjaa kasvatettiin Milliporeen, Amsbion ja Cellsystems MEF-solujen kanssa.

TAULUKKO 6. Solulinjojen morfologiset tulokset, kun ne kasvoivat Milliporeen valmistamien hiiren alkion ihon fibroblastisolujen kanssa

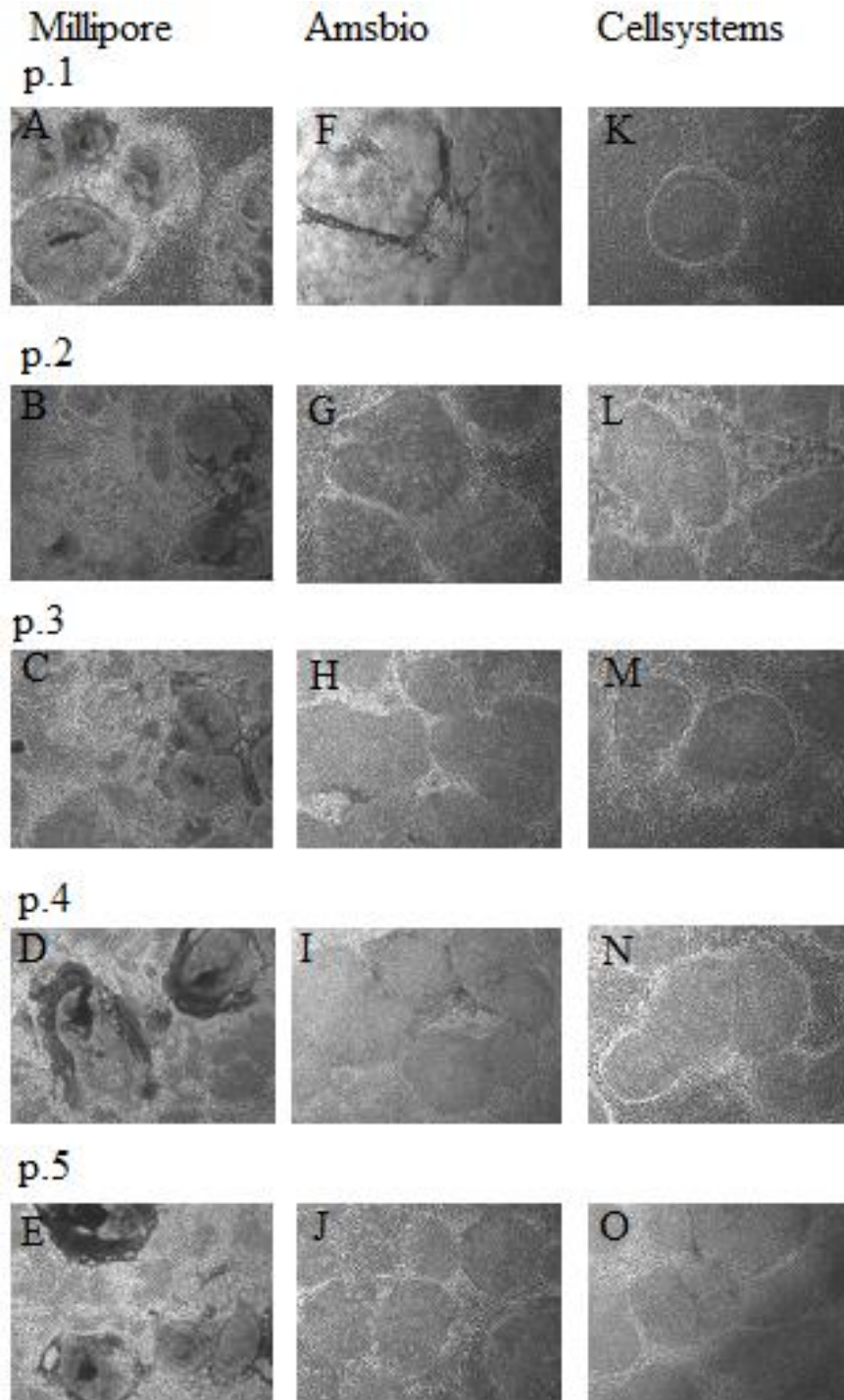
	Solulinja	Solulinja
	UTA.05404.CPVT	UTA.07001.CPVT
solujako-numero	Morfologiset tulokset	Morfologiset tulokset
p.1	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi vähän kolonioita. • Paljon erilaistunutta solukasvustoa. • Jakosuhde oli 1:6. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kolonnit olivat rikkonaisia ja ohuita siivuja, joiden mukana oli vain pari hyvää koloniam. • Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. • Jaossa yhdistettiin 3 kaivoa, jotta saatiin 2 kaivoa.
p.2	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta ja huonon näköistä solukasvustoa. • MEF-solut irtosivat helposti ottaen mukaansa kolonioita. • Jakosuhde oli 1:4. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kolonioiden ympärillä oli vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-solut irtosivat helposti ottaen mukaansa kolonioita. • Jakosuhde oli 1:4.
p.3	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta ja rosoista solukasvustoa. • Koloniat eivät olleet selvärajaisia. • MEF-solut irtosivat helposti ottaen mukaansa kolonioita. • Jakosuhde oli 1:3 	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta ja huonon näköistä solukasvustoa. • MEF-solut irtosivat helposti ottaen mukaansa kolonioita. • Jakosuhde oli 1:2.
p.4	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat erilaistuneita ja rosoisia. • Jakosuhde oli 1:3. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta ja rosoista solukasvustoa. • Jakosuhde oli 1:3.
p.5	<ul style="list-style-type: none"> • Erilaistunutta solukasvustoa oli paljon, vain muutama paremman näköinen kolonia. • Jakosuhde oli 1:4 	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. • Jakosuhde oli 1:2.

TAULUKKO 7. Solulinjojen morfologiset tulokset, kun ne kasvoivat Amsbion valmistamien hiiren alkion ihon fibroblastisolujen kanssa

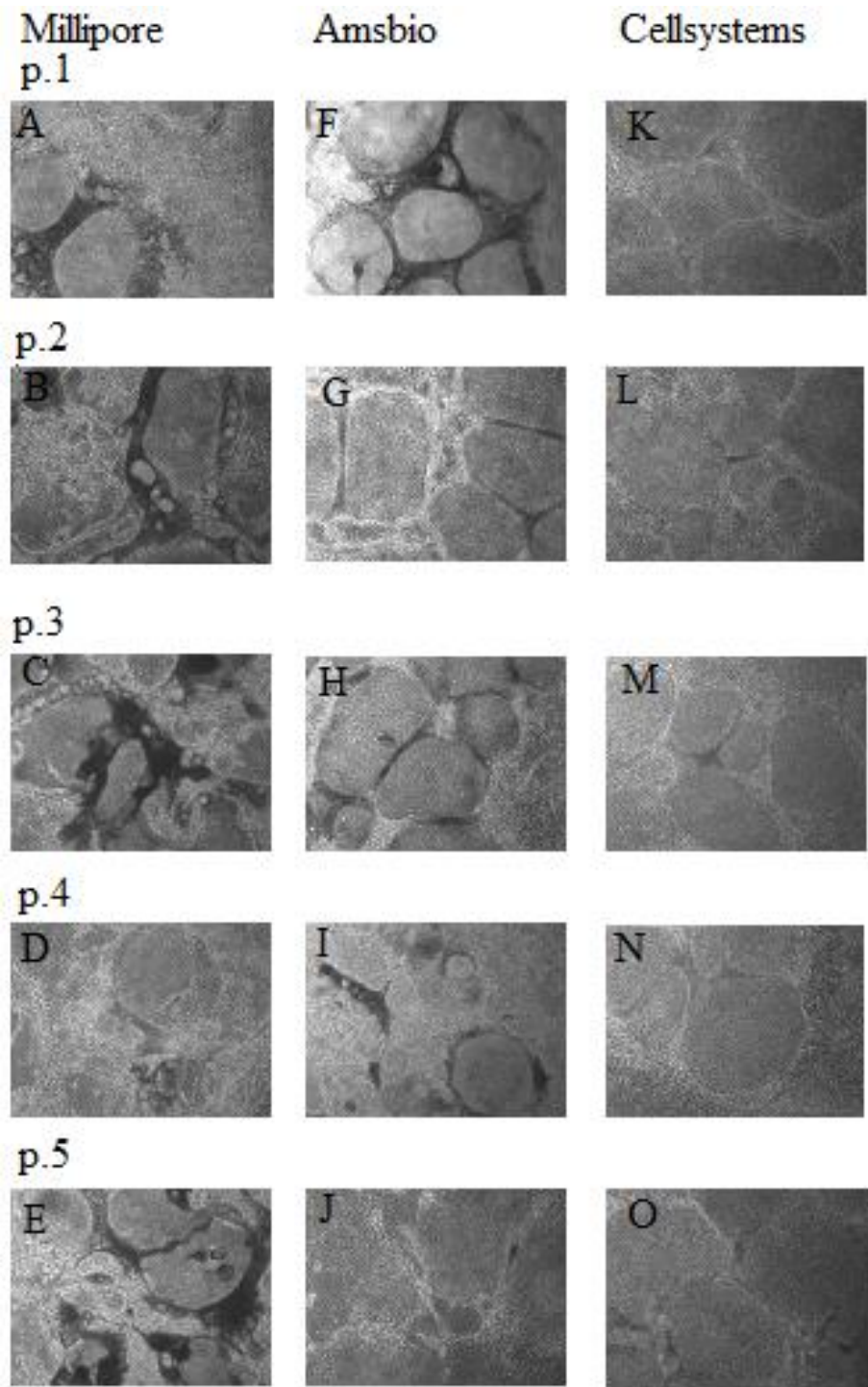
	Solulinja	Solulinja
	UTA.05404.CPVT	UTA.07001.CPVT
Solujako-numero	Morfologiset tulokset	Morfologiset tulokset
p.1	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-soluja oli vaikea irrottaa pohjasta raaputtamalla. • Koloniat eivät irronneet MEF-solujen mukaan jakotilanteessa. • Jakosuhde oli 1:6. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-soluja oli vaikea irrottaa pohjasta raaputtamalla. • Koloniat eivät irronneet MEF-solujen mukaan jakotilanteessa. • Jakosuhde oli 1:6.
p.2	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat isoja ja tiiviitä. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-solut irtosivat hyvin. • Jakosuhde oli 1:6. 	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-solut irtosivat hyvin. • Jakosuhde oli 1:6.
p.3	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • Koloniat olivat tiiviitä • MEF-soluja oli vaikea irrottaa pohjasta raaputtamalla ja koloniat eivät irronneet niiden mukaan. • Jakosuhde oli 1:7. 	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-soluja oli vaikea irrottaa pohjasta raaputtamalla. • Koloniat eivät irronneet MEF-solujen mukaan jakotilanteessa. • Jakosuhde oli 1:7.
p.4	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-solut irtosivat huonosti kolonioista. • Jakosuhde oli 1:6. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kaivossa kasvoi valtavasti erilaistunutta solukasvustoa, joiden mukana oli vain pari hyvää koloniaa. • Jakosuhde oli 1:1
p.5	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat isoja ja tiiviitä. Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-solut olivat vaikea irrottaa. • Jakosuhde oli 1:6. 	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat eivät olleet selvärajaisia ja tiiviitä. • Kaivossa kasvoi erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-solut oli vaikea irrottaa pohjasta. • Jakosuhde oli 1:2.

TAULUKKO 8. Solulinjojen morfologiset tulokset, kun ne kasvoivat Cellsystemsissä valmistamien hiiren alkion ihon fibroblastisolujen kanssa

	Solulinja	Solulinja
	UTA.05404.CPVT	UTA.07001.CPVT
solujako-numero	Morfologiset tulokset	Morfologiset tulokset
p.1	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi hyvin vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF-solut irtosivat erittäin hyvin pohjasta ja kolonioista. • Jakosuhde oli 1:6. 	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF- solut irtosivat helposti pohjasta. • Jakosuhde oli 1:7.
p.2	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF- solut irtosivat helposti pohjasta. • Jakosuhde oli 1:7. 	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF- solut irtosivat helposti pohjasta. • Jakosuhde oli 1:7.
p.3	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF- solut irtosivat helposti pohjasta. • Jakosuhde oli 1:7. 	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF- solut irtosivat helposti pohjasta. • Jakosuhde oli 1:7.
p.4	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF- solut irtosivat helposti pohjasta. • Jakosuhde oli 1:7. 	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF- solut irtosivat helposti pohjasta. • Jakosuhde oli 1:7.
p.5	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF- solut irtosivat helposti pohjasta. • Jakosuhde oli 1:7. 	<ul style="list-style-type: none"> • Koloniat olivat tiiviitä ja selvärajaisia. • Kaivossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. • MEF- solut irtosivat helposti pohjasta. • Jakosuhde oli 1:7.

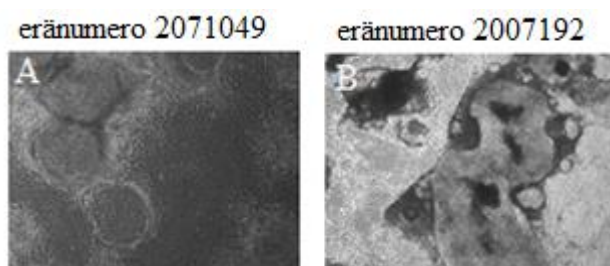


KUVA 2. Solulinjan UTA.05404.CPVT kuvat morfologiasta, kun niitä kasvatettiin Milliporeen, Amsbion ja Cellsystems MEF-solujen kanssa. Solulinjaa on kasvatettu Milliporeen MEF-solujen kanssa kuvissa A-E, Amsbion MEF-solujen kanssa kuvissa F-J ja Cellsystems MEF-solujen kanssa kuvissa K-O. Kuvat A-O on otettu nelinkertaisella suurennoksella.



KUVA 3. Solulinjan UTA.07001.CPVT kuvat morfologiasta, kun niitä kasvatettiin Milliporeen, Amsbion ja Cellsystems MEF-solujen kanssa. Solulinjaa on kasvatettu Milliporeen MEF-solujen kanssa kuvissa A-E, Amsbion MEF-solujen kanssa kuvissa F-J ja Cellsystems MEF-solujen kanssa kuvissa K-O. Kuvat A-O on otettu nelinkertaisella suurennoksella.

Sydänryhmä käytti ennen MEF-solujen testausta Milliporeen valmistamia MEF-soluja. Testauksen yhteydessä huomattiin, että MEF-solutuotteiden eränumeroissa oli eroja. Kun solulinjoja kasvatettiin MEF-soluilla, joiden eränumero oli 2071049, solukoloniat näyttivät selvärajaisille ja kaivoissa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. Kun solulinjoja kasvatettiin MEF-soluilla, joiden eränumero oli 2007192, solukolonioita oli kaivoissa erittäin vähän ja kaivoissa kasvoi todella paljon erilaistunutta ja röpöliäistä solukasvustoa. Kuvassa 4 on kuvat solulinjasta UTA.05404.CPVT, kun se kasvaa MEF-solujen kanssa, joilla on eri eränumerot.



KUVA 4. Solulinjan UTA.05404.CPVT kuvat, kun se kasvaa Milliporeen MEF-solujen kanssa, joilla on eri eränumerot. Kuva A on otettu, kun solulinjan solujakonumero oli 31. Kuva B on otettu, kun solulinjan solujakonumero oli 21. Kuvat A ja B on otettu nelinkertaisella suurennoksella.

5.1.2 Immunovärjäystulokset

Kun solulinjoja UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT kasvatettiin Milliporeen valmistamien MEF-solujen kanssa, solukoloniat ilmentivät kaikkia muita pluripotenssimarkkerigeenejä paitsi nanogia ja SSEA-4:sta. Pluripotenssimarkkerigeenit oct, tra-1-60, tra-1-81 ja sox-2 näkyivät haaleasti tummaa taustaa vasten. Ki-67 primaarivasta-aineen avulla saatiin selville, että yhdessä kaivossa oli 120-200 jakautuvaa MEF-solua. Tarkkaa määrää oli vaikea laskea jakautuvien iPS-solujen vuoksi.

Kun solulinjoja kasvatettiin Amsbion valmistamien MEF-solujen kanssa, solukoloniat ilmentivät kaikkia muita pluripotenssimarkkerigeenejä paitsi nanogia, SSEA-4:sta ja sox-2:sta. Ki-67 primaarivasta-aineen avulla saatiin selville, että kaivossa esiintyi

jakautuvia MEF-soluja välillä 20-100. Tarkkaa määrää oli vaikea laskea jakautuvien iPS-solujen vuoksi.

Kun solulinjoja kasvatettiin Cellsystemsien valmistamien MEF-solujen kanssa, solukoloniati ilmentivät kaikkia muita pluripotenssimarkkerigeenejä paitsi nanogia ja SSEA-4:sta. Ki-67 primaarivasta-aineen avulla saatiin selville, että kaivoissa esiintyi hyvin eri määrät jakautuvia MEF-soluja. Jakautuvia MEF-soluja esiintyi solujakonumeron ollessa kaksi välillä 10-100 ja solujakonumeron ollessa viisi yli 100 – yli 200 välillä. Tarkkaa määrää oli vaikea laskea jakautuvien iPS-solujen vuoksi.

Sekundaarikontrollinäytteeseen ei aiheutunut käytetyistä sekundaarivasta-aineista värjäytyneitä kohtia, joten sekundaarivasta-aineet olivat kunnossa. Taulukkoon 9 on merkitty pluripotenssimarkkerigeenien ilmeneminen solulinjoissa, kun niitä kasvatettiin eri valmistajien MEF-solujen kanssa. Taulukkoon 10 on merkitty eri valmistajien MEF-solujen jakautuvat määrät, kun solulinja UTA.05404.CPVT kasvoi MEF-solujen kanssa. Taulukkoon 11 on puolestaan merkitty eri valmistajien MEF-solujen jakautuvat määrät, kun solulinja UTA.07001.CPVT kasvoi MEF-solujen kanssa. Kuvassa 5 on immunovärjäyskuvat solulinjoista, kun ne kasvoivat Milliporeen MEF-solujen kanssa. Kuvassa 6 on immunovärjäyskuvat solulinjoista, kun ne kasvoivat Amsbion MEF-solujen kanssa. Kuvassa 7 on immunovärjäyskuvat solulinjoista, kun ne kasvoivat Cellsystemsien MEF-solujen kanssa. Kuva 8 on esimerkkikuva siitä, miltä jakautuvat MEF-solut ja iPS-solut näyttivät.

TAULUKKO 9. Pluripotenssimarkkerigeenien ilmeneminen solulinjojen UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT kolonneissa solujakonumeron ollessa 2 ja 5

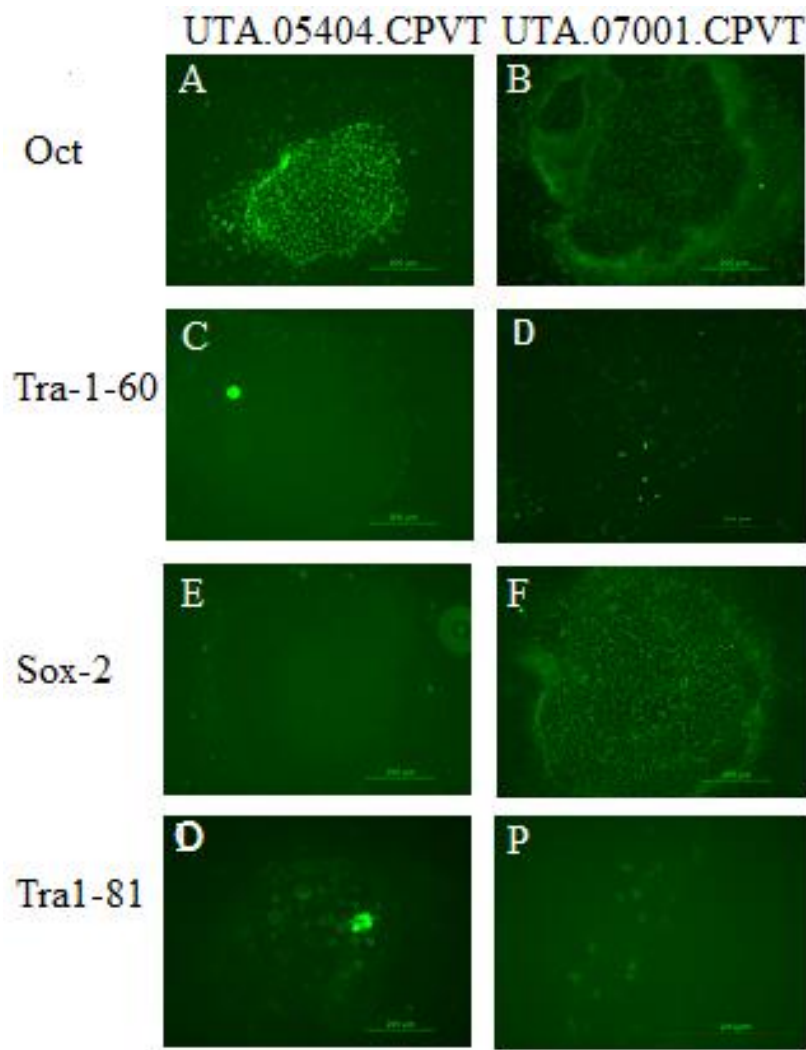
Primaari-vasta-aine	Millipore	Amsbio	Cellsystems
Nanog	Todella heikko (ei kuvaa)	Todella heikko (ei kuvaa)	Ei
Oct	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Tra-1-60	Haalea	Kyllä	Kyllä
Tra-1-81	Haalea	Kyllä	Kyllä
SSEA-4	Ei	Ei	Ei
Sox-2	Haalea/kyllä	Ei	Kyllä
Ki-67	Kyllä	Kyllä	Kyllä

TAULUKKO 10. Jakautuvien MEF-solujen määrä eri valmistajien tuotteissa, kun MEF-solujen kanssa kasvoi solulinja UTA.05404.CPVT

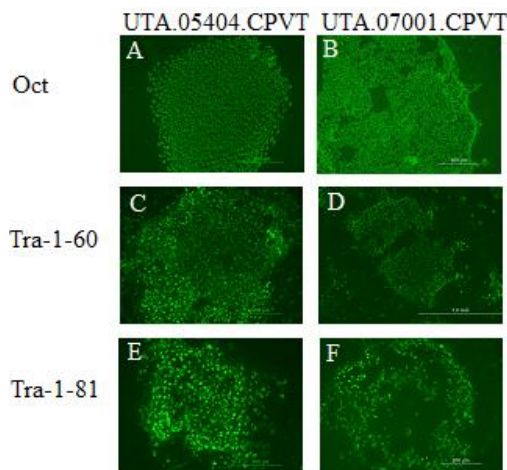
	Jakautuvien MEF-solujen määrä		
Solujako-numero	Millipore	Amsbio	Cellsystems
p.2 (kahdesta kaivosta laskettu)	Tasaisesti joka puolella molemmissa	yli 20 ja yli 67	15 ja 97
p.5 (kahdesta kaivosta laskettu)	126 ja 180	yli 30 molemmissa	yli 200 molemmissa

TAULUKKO 11. Jakautuvien MEF-solujen määrä eri valmistajien tuotteissa, kun MEF-solujen kanssa kasvoi solulinja UTA.07001.CPVT

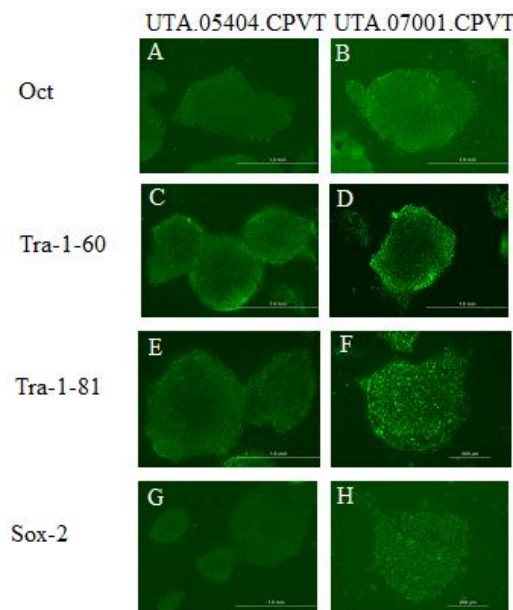
	Jakautuvien MEF-solujen määrä		
Solujako-numero	Millipore	Amsbio	Cellsystems
p.2 (kahdesta kaivosta laskettu)	Tasaisesti joka puolella molemmissa	yli 40 ja yli 80	35 ja 51
p.5 (kahdesta kaivosta laskettu)	Tasaisesti joka puolella molemmissa	72 ja 92	yli 100 ja yli 150



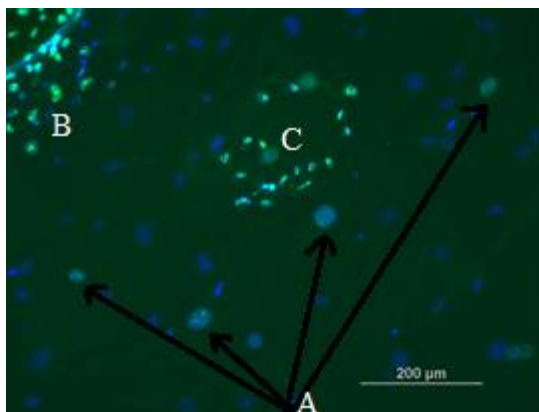
KUVA 5. Solulinjojen UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT immunovärjäyskuvat, kun solulinjat olivat kasvaneet Milliporeen MEF-solujen kanssa viisi solujakonumeroa. Pluripotenssimarkkerigeeni on kuvissa A-B Oct, kuvissa C-D Tra-1-60, kuvissa E-F Sox-2 ja kuvissa O-P Tra1-81. Kuvissa A-F ja O on käytetty 10-kertaista suurennosta ja kuvassa P on käytetty 20-kertaista suurennosta.



KUVA 6. Solulinjojen UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT immunovärjäyskuvat, kun ne olivat kasvaneet Amsbion MEF-solujen kanssa kaksi solujakonumeroa. Pluripotenssimarkkerigeeni on kuvissa A-B Oct, kuvissa C-D Tra-1-60 ja kuvissa E-F Tra-1-81. Kuvassa D oli käytetty nelinkertaista ja kuvissa A-C ja E-F oli käytetty 10-kertaista suurennosta.



KUVA 7. Solulinjojen UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT immunovärjäyskuvat, kun solulinjat olivat kasvaneet Cellsystems MEF-solujen kanssa kaksi solujakonumeroa. Pluripotenssimarkkerigeeni on kuvissa A-B Oct, kuvissa C-D Tra-1-60, kuvissa E-F Tra-1-81 ja kuvissa G-H Sox-2. Kuvissa A-E ja G oli käytetty nelinkertaista ja kuvissa F ja H oli käytetty 10-kertaista suurennosta.



KUVA 8. Tumissa Ki-67:lla värjäytyneet kohdat näkyvät vihreänä. Kohdasta A lähtevät nuolet osoittavat jakautuvat MEF-solut. Kohdat B ja C osoittavat jakautuvat iPS-solut. Sinisellä värjäytyneet kohdat ovat solujen tumia, jotka ovat värjäytyneet DAPI:lla. Kuva on otettu, kun solulinja UTA.07001.CPVT oli kasvanut Cellsystems MEF-solujen kanssa kaksi solujakonumeroa.

5.2 Mitomysiini C

Kun inaktivoimattomat MEF-solut käsiteltiin Sigman valmistamalla mitomysiini C:llä, solut olivat lyhyempiä kuin kontrollissa, jota ei oltu käsitelty mitomysiini C:llä. Soluja oli kaikista vähiten muihin verrattuna. Seitsemäntenä päivänä soluihin oli alkanut muodostua vähän rihmaa ja ne olivat haaroittuneita. Neljäntenä päivänä fiksatussa levyssä oli viisi jakautuvaa MEF-solua ja 11. päivänä fiksatussa levyssä ei jakautuvia MEF-soluja havaittu ollenkaan.

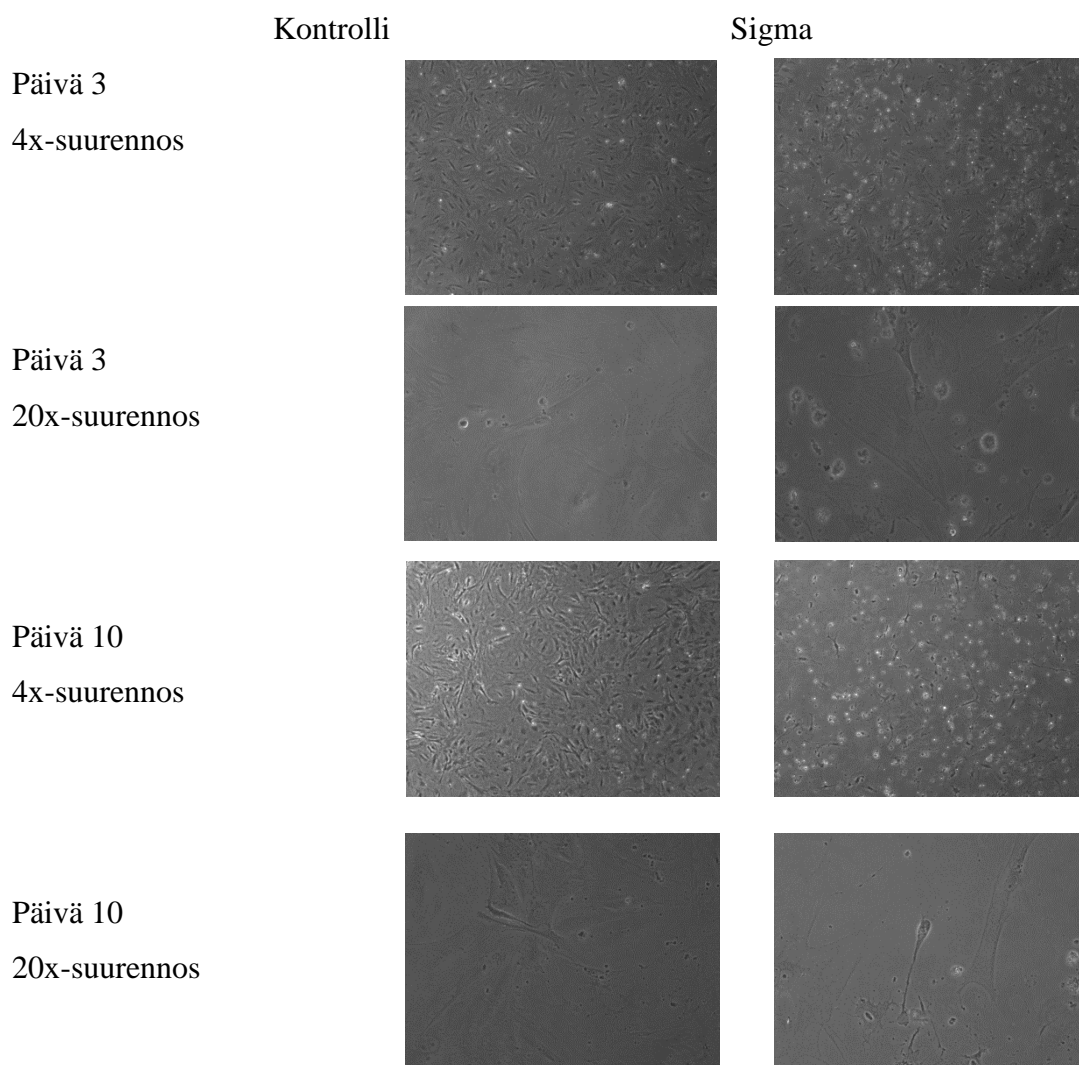
Kun MEF-solut käsiteltiin Santa Cruzin valmistamalla mitomysiini C:llä, solut olivat alusta alkaen pitkiä ja rihmamaisia. Solujen rihmamaisuuden määrä kasvoi entisestään kymmenenteen päivään mennessä. Kaivoissa oli myös eniten jakautuvia MEF-soluja, sillä neljäntenä päivänä oli 24 jakautuvaa ja 11. päivänä oli 18 jakautuvaa MEF-solua.

Kun MEF-solut käsiteltiin Tocriksen valmistamalla mitomysiini C:llä, solut olivat alussa sileitä ja pitkiä, joissa oli vähän rihmaa. Solumäärä väheni noin puoleen kymmenenteen päivään mennessä ja niihin oli muodostunut vähän lisää rihmaa. Kaivoissa oli jakautuvia MEF-soluja neljäntenä päivänä neljä ja 11. päivänä yksi.

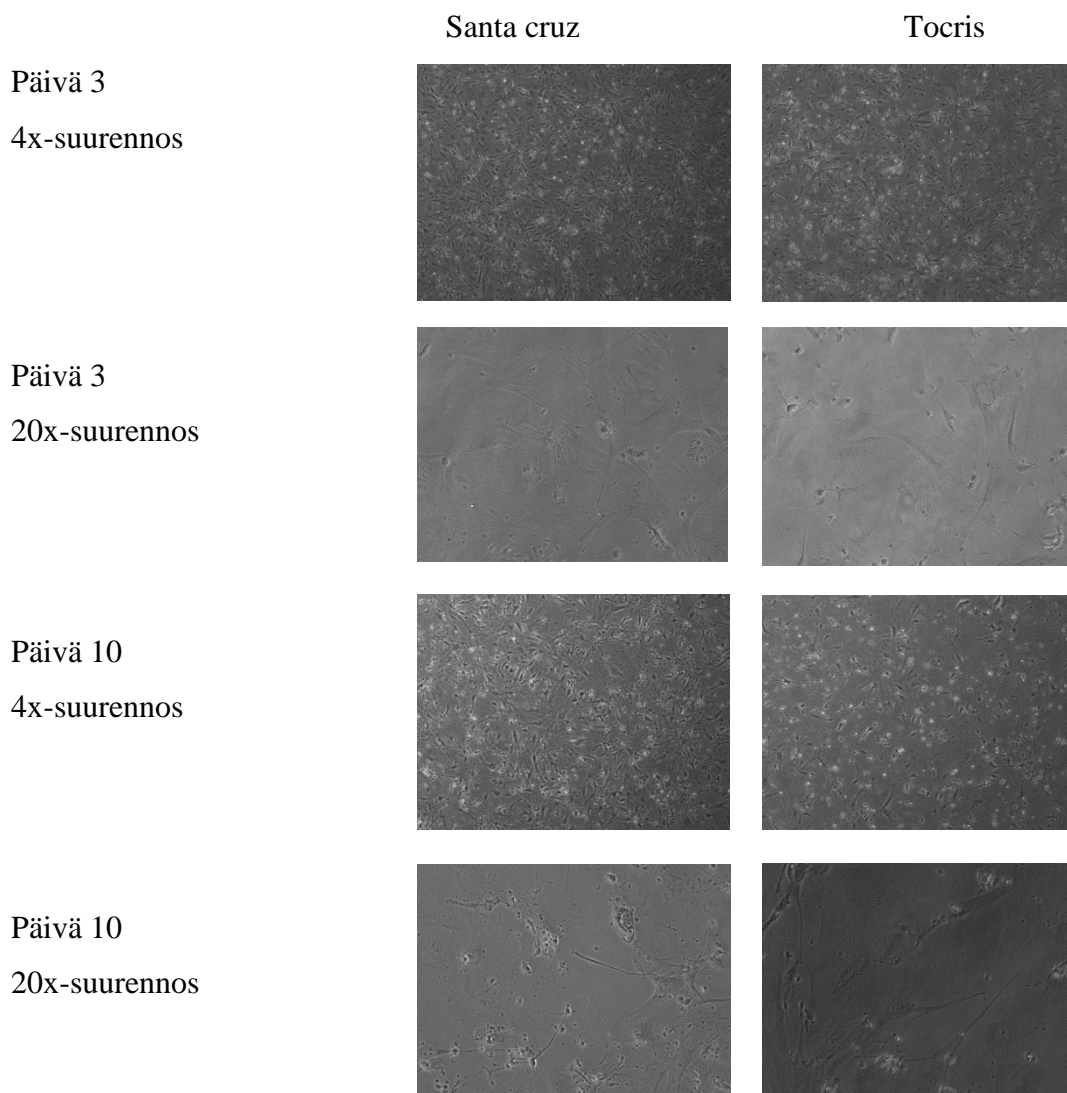
Taulukossa 12 on MEF-solujen morfologiset tulokset, kun ne oli käsitelty eri valmistajien mitomysiini C:llä. Kuvassa 9 on kuvat kontrollin käsittelemättömien MEF-solujen ja Sigman mitomysiini C:llä käsiteltyjen MEF-solujen morfologiasta. Kuvassa 10 on kuvat solujen morfologiasta, kun MEF-solut oli käsitelty Santa Cruzin ja Tocriksen mitomysiini C:llä. Taulukkoon 13 on merkitty jakautuvien MEF-solujen määrät mitomysiini C käsittelyjen jälkeen. Kuva 11 on esimerkkikuva jakautuvasta MEF-solusta, joka on otettu kontrollista.

TAULUKKO 12. Mitomysiini C käsiteltyjen MEF-solujen morfologiset tulokset

	Kontrolli	Sigma
Päivä 3	<ul style="list-style-type: none"> Solut olivat pitkulaisia ja sileitä. Kaivoissa oli vähiten kuolleita soluja. kaivoissa oli toiseksi eniten soluja. 	<ul style="list-style-type: none"> Solut olivat sileitä ja pitkulaisia, mutta ne olivat lyhyempiä kuin kontrollin solut. Soluja oli harvassa ja niitä oli vähiten muihin verrattuna.
Päivä 7	<ul style="list-style-type: none"> Näytti samanlaiselta kuin päivänä 3. Soluja oli tullut vähän lisää. 	<ul style="list-style-type: none"> Näytti samanlaiselta kuin päivänä 3. Solumäärä oli pysynyt samanlaisena.
päivä 10	<ul style="list-style-type: none"> Soluja oli paljon enemmän kuin päivänä 3. Soluihin oli muodostunut vähän rihmaa. 	<ul style="list-style-type: none"> Soluja oli vähemmän kuin päivänä 3 ja 7. Soluihin oli muodostunut vähän rihmaa ja ne olivat haaroittuneita.
	Santa Cruz	Tocris
Päivä 3	<ul style="list-style-type: none"> Solut olivat pitkiä ja rihmamaisia. Soluja oli eniten. 	<ul style="list-style-type: none"> Solut olivat sileitä ja pitkiä, mutta niissä oli havaittavissa myös vähän rihmaa. Soluja oli vähän vähemmän kuin kontrollissa.
Päivä 7	<ul style="list-style-type: none"> Soluja oli vähemmän kuin päivänä 3. 	<ul style="list-style-type: none"> Näytti samanlaiselta kuin päivänä 3. Solumäärä oli pysynyt samanlaisena.
päivä 10	<ul style="list-style-type: none"> Solumäärä oli pysynyt samanlaisena kuin päivänä 7. Soluihin oli muodostunut paljon rihmamaista kasvustoa. 	<ul style="list-style-type: none"> Solumäärä oli vähentynyt noin puoleen, päivään 3 nähden. Soluihin oli muodostunut vähän rihmaa.



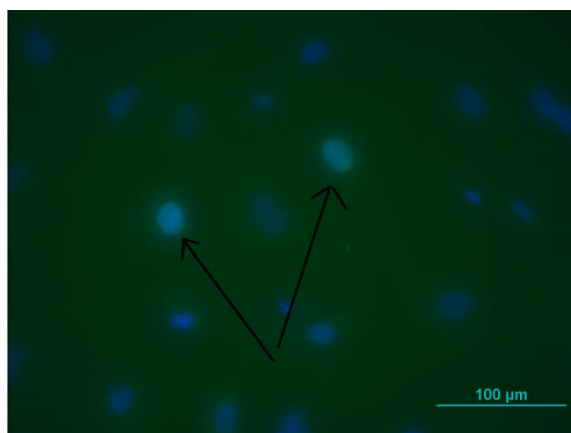
KUVA 9. Kontrollin ja Sigman mitomysiini C käsiteltyjen MEF-solujen kuvat morfologiasta. Kuvat oli otettu kolmannen ja kymmenennen päivän jälkeen, joissa oli käytetty nelin- ja 20-kertaista suurennosta.



KUVA 10. Santa Cruzin ja Sigman mitomysiini C käsiteltyjen MEF-solujen kuvat morfologiasta. Kuvat oli otettu kolmannen ja kymmenennen päivän jälkeen, joissa oli käytetty nelin- ja 20-kertaista suurennosta.

TAULUKKO 13. MEF-solujen jakautuminen mitomysiini C käsittelyn jälkeen.

	12-kuoppalevy 1, fiksattu päivänä 4	12-kuoppalevy 2, fiksattu päivänä 11
	Värjäytyneiden tumien määrä	
Värjäyslaimennos	-	Laimennoksissa ei huomattu selkeitä eroja tumien värjäytymisessä.
Kontrolli	Joka puolella kaivoa	Joka puolella kaivoa
Sigma	5	0
Santa Cruz	24	18
Tocris	4	1



KUVA 11. Positiivinen tulos jakautuvasta MEF-solusta. Kuvassa nuolilla on osoitettu jakautuva tuma, joka oli värjäytynyt Ki-67:lla. Ki-67:lla värjäytyneet kohdat näkyvät kuvassa vihreänä. Sinisenä kuvassa näkyvät kaikkien solujen tumat, jotka ovat värjäytyneet DAPI:lla. Kuva on otettu 12-kuoppalevyiltä 2 kontrollista, joka on värjätty Ki-67:n 1:800-laimennoksella.

5.3 Fibroblasti-kasvutekijä

Seuraavissa alaluvuissa on tarkasteltu iPS-solulinjojen UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT morfologisia ja immunovärjäys tuloksia, kun KSR-mediumin joukossa käytettiin eri valmistajien fibroblasti-kasvutekijää.

5.3.1 Morfologiset tulokset

Kun KSR-mediumin joukkoon laitettiin R&D Systemsin valmistamaa fibroblasti-kasvutekijää, solulinjojen UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT kaivoissa oli havaittavissa paljon erilaistunutta ja rosoista solukasvustoa. MEF-solut irtosivat pohjasta helposti, mutta ottivat kolonioita mukaansa. MEF-solukerros oli paksu.

Kun KSR-mediumin joukkoon laitettiin PeproTechin valmistamaa fibroblasti-kasvutekijää, solulinjojen kaivoissa oli hyvin vähän erilaistunutta solukasvustoa. Koloniat näyttivät sileiltä ja tasaisilta ja ne olivat selvärajaisia. Kun soluja jaettiin,

MEF-solut olivat tiukasti kaivon pohjassa kiinni, mutta ne eivät ottaneet kolonioita mukaansa. MEF-solukerros oli ohuempi kuin R&D Systemsin FGF:n kanssa. Kaivoissa, joihin laitettiin PeproTechin valmistamaa FGF:ä, oli enemmän soluja verrattuna kaivoihin, joihin oli laitettu R&D Systemsin valmistamaa FGF:ä.

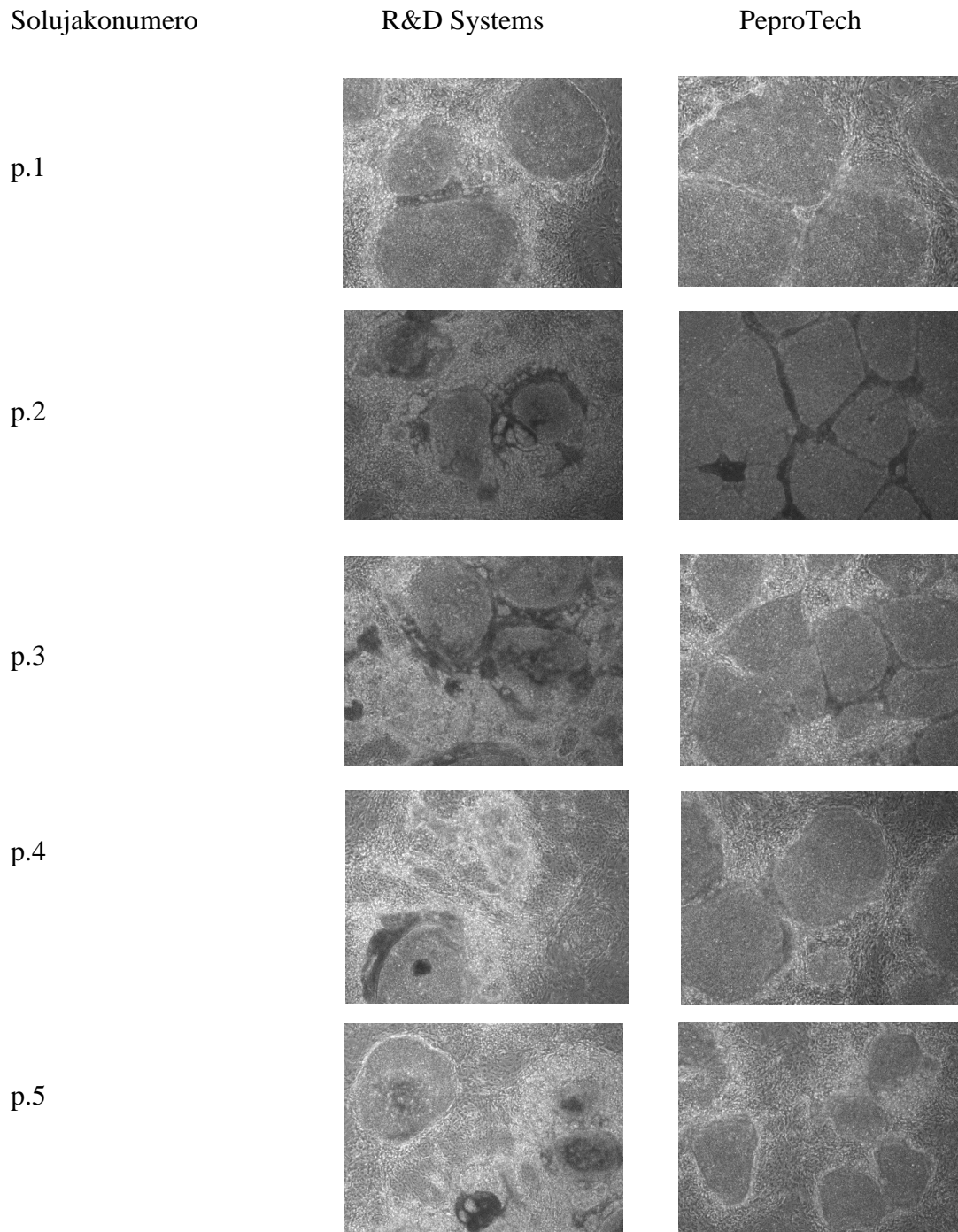
Taulukkoon 14 on merkitty UTA.05404.CPVT solulinjan morfologiset tulokset ja taulukkoon 15 on merkitty UTA.07001.CPVT solulinjan morfologiset tulokset, kun mediumissa oli R&D Systemsin ja PeproTechin valmistamaa FGF:ä. Kuvassa 12 on kuvat UTA.05404.CPVT solulinjan morfologiasta, kun mediumissa oli R&D Systemsin ja PeproTechin valmistamaa FGF:ä ja kuvassa 13 on kuvat UTA.07001.CPVT solulinjan morfologiasta.

TAULUKKO 14. Solulinjan UTA.05404.CPVT morfologiset tulokset, kun testattiin eri valmistajien fibroblasti-kasvutekijöitä

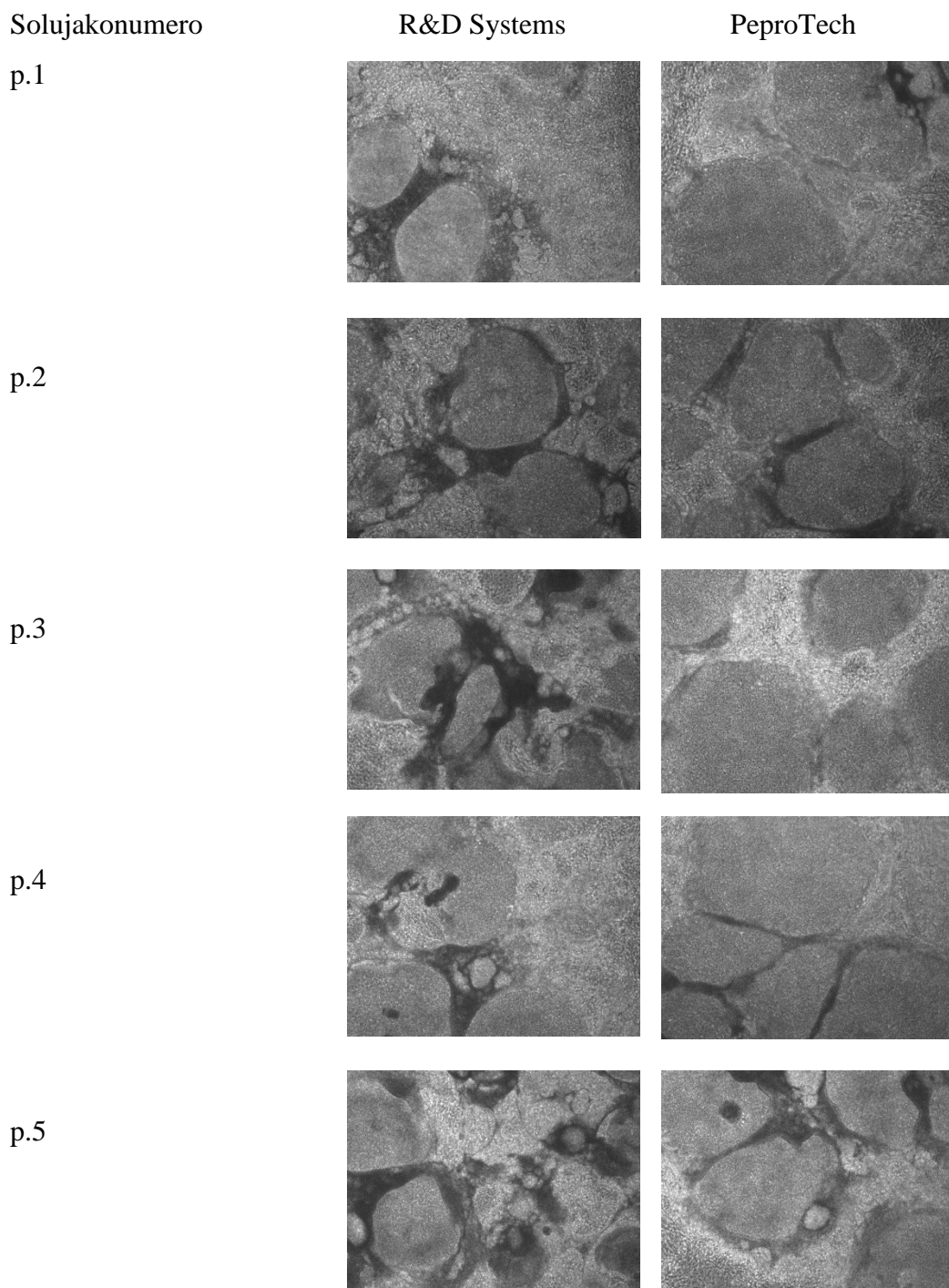
Solujako -numero	R&D Systems	PeproTech
p.1	<ul style="list-style-type: none"> Kolonioita oli vähemmän kuin toisessa tutkittavassa FGF:ssä. kaivossa kasvoi enemmän erilaistunutta solukasvustoa kuin toisessa tutkittavassa FGF:ssä. Jakosuhde oli 1:6. 	<ul style="list-style-type: none"> Kaivossa kasvoi todella vähän erilaistunutta solukasvustoa. Jakosuhde oli 1:7.
p.2	<ul style="list-style-type: none"> Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solut irtosivat helposti, mutta ottivat mukaansa kolonioita. Jakosuhde oli 1:4. 	<ul style="list-style-type: none"> Kolonioiden olivat selvärajaisia. Kaivoissa kasvoi hyvin vähän erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solut oli aika tiukasti kiinni pohjassa. Jakosuhde oli 1:7.
p.3	<ul style="list-style-type: none"> Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta ja rosoista solukasvustoa. Selvärajaisia kolonioita ei ollut. MEF-solut irtosivat helposti, mutta ottivat mukaansa kolonioita. Jakosuhde oli 1:3. 	<ul style="list-style-type: none"> Kolonioiden olivat isoja ja selvärajaisia. MEF-solut eivät irrottaneet mukaansa kolonioita, mutta ne olivat tiukemmin kiinni pohjassa kuin toisella FGF:llä, joka hankaloitti MEF-solujen irrottamista. Jakosuhde oli 1:7.
p.4	<ul style="list-style-type: none"> Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta ja rosoista solukasvustoa. Jakosuhde oli 1:3. 	<ul style="list-style-type: none"> Kolonioiden olivat isoja ja selvärajaisia. Kaivoissa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solut irtosivat helposti. Jakosuhde oli 1:7.
p.5	<ul style="list-style-type: none"> Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. Kaivossa kasvoi muutama selvärajainen kolonia. Jakosuhde oli 1:4. 	<ul style="list-style-type: none"> Kolonioiden ympärillä oli vähän erilaistunutta solukasvustoa. Jakosuhde oli 1:6.

TAULUKKO 15. Solulinjan UTA.07001.CPVT morfologiset tulokset, kun testattiin eri valmistajien fibroblasti-kasvutekijöitä

Solujako -numero	R&D Systems	PeproTech
p.1	<ul style="list-style-type: none"> Kaivossa oli pari selvärajaista koloniaa ja muut olivat rikkonaisia kolonioita. Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. Jakotilanteessa yhdistettiin 3 kaivoa, jotta saatiin 2 uutta kaivoa. 	<ul style="list-style-type: none"> Kaivoissa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. Jakosuhde oli 1:6.
p.2	<ul style="list-style-type: none"> Kolonioiden ympärillä kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solut irtosivat helposti, mutta ottivat kolonioita mukaansa. Jakosuhde oli 1:4. 	<ul style="list-style-type: none"> Kolonioiden ympärillä kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solut olivat tiukemmin pohjassa kiinni kuin toisessa FGF:ssä. Jakosuhde oli 1:6.
p.3	<ul style="list-style-type: none"> Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solut irrottivat kolonioita mukaansa. Jakosuhde oli 1:2. 	<ul style="list-style-type: none"> Kolonioiden ympärillä kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solut irtosivat helposti. Jakosuhde oli 1:5.
p.4	<ul style="list-style-type: none"> Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. Kolonioiden ympärillä kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. Jakosuhde oli 1:3. 	<ul style="list-style-type: none"> Kolonioiden ympärillä kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. MEF-solut irtosivat helposti. Jakosuhde oli 1:7.
p.5	<ul style="list-style-type: none"> Kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa joka puolella. Jakosuhde oli 1:2. 	<ul style="list-style-type: none"> Kaivoissa kasvoi erilaistunutta solukasvustoa. Jakosuhde oli 1:6.



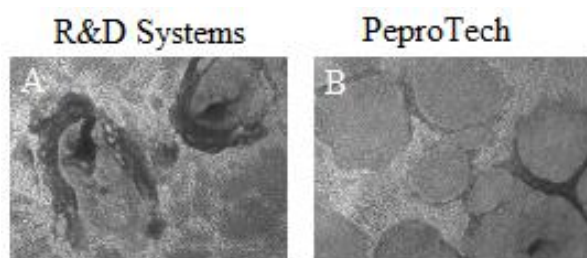
KUVA 12. R&D Systemsin ja Pepto Techin valmistamien fibroblasti-kasvutekijöiden vaikutukset solulinjan UTA.05404.CPVT morfologiaan. Solulinjoja tarkasteltiin viidessä eri solujakonumerossa. Kuvat on otettu nelinkertaisella suurennoksella.



KUVA 13. R&D Systemsin ja Pepro Technin valmistamien fibroblasti-kasvutekijöiden vaikutukset solulinjan UTA.07001.CPVT morfologiaan. Solulinjoja tarkasteltiin viidessä eri solujakonumerossa. Kuvat on otettu nelinkertaisella suurennoksella.

Testauksien yhteydessä huomattiin, että MEF-solutuotteiden eränumeroissa oli eroja. Kun solulinjoja kasvatettiin MEF-soluilla, joiden eränumero oli 2071049, kaivoissa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa kolonioiden ympärillä. Kun solulinjoja kasvatettiin MEF-soluilla, joiden eränumero oli 2007192, kaivoissa kasvoi todella

paljon erilaistunutta solukasvustoa. Tehtiin testaus, jossa KSR-mediumiin lisättiin PeproTechin valmistamaa FGF:ä ja solulinjoja kasvatettiin MEF-solujen kanssa, joiden eränumero oli 2007192. PeproTechin FGF:n vaikutuksesta kaivoissa kasvoi hyvin vähän erilaistunutta solukasvustoa kolonioiden välillä ja koloniat olivat selvärajaisia ja tiiviitä. R&D Systemsin FGF:n ei vaikuttanut kunnolla solulinjojen erilaistumiseen, jonka vuoksi kaivossa kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. Kuvassa 14 on kuvat solulinjasta UTA.05404.CPVT, kun se kasvaa MEF-solujen kanssa, joiden eränumero on 2007192. KSR-mediumiin oli lisätty eri valmistajan FGF:ä.



KUVA 14. Solulinjan UTA.05404.CPVT kuvat morfologiasta solulinjan jakonumeron ollessa 20, kun sitä kasvatettiin MEF-soluilla, joiden eränumero oli 2007192. Kuvassa A KSR-mediumiin on lisätty R&D Systemsin valmistamaa FGF:ä. Kuvassa B KSR-mediumiin on lisätty PeproTechin valmistamaa FGF:ä. Kuvat A-B on otettu nelinkertaisella suurennoksella.

5.3.2 Immunovärjäystulokset

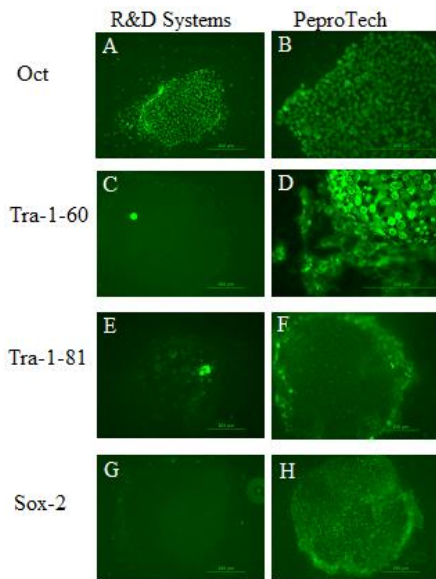
Solulinjoja UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT kasvatettiin KSR-mediumilla, jonka joukossa oli eri valmistajien valmistamaa fibroblasti-kasvutekijää. Kun solulinjoja kasvatettiin R&D Systemsin valmistaman FGF:n kanssa, solukoloniat ilmentivät kaikkia muita pluripotenssimarkkerigeenejä paitsi nanogia ja SSEA-4:sta. Pluripotenssimarkkerigeenit tra-1-60 ja tra-1-81 näkyivät haaleasti tummaa taustaa vasten. Kun solulinjoja kasvatettiin PeproTechin valmistaman FGF:n kanssa, solukoloniat ilmentivät kaikkia muita pluripotenssimarkkerigeenejä paitsi nanogia ja SSEA-4:sta. Solulinjan UTA.05404.CPVT pluripotenssimarkkerigeenit tra-1-60 ja tra-1-81 ja sox-2 näkyivät selvästi tummaa taustaa vasten, mutta solulinjan

UTA.07001.CPVT pluripotenssimarkkerigeenit tra-1-60, tra-1-81 ja sox-2 näkyivät haaleasti tummaa taustaa vasten.

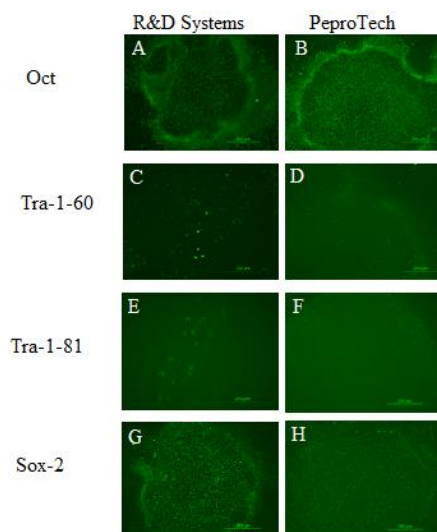
Taulukkoon 16 on merkitty solulinjojen UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT pluripotenssimarkkerigeenien läsnäolo. Kuvassa 15 on solulinjan UTA.05404.CPVT ja kuvassa 16 on solulinjan UTA.07001.CPVT immunovärjäyskuvat niiden kasvaessa KSR-mediumissa, jossa oli R&D Systemsin ja PeproTechin valmistamaa FGF:ä.

TAULUKKO 16. Solulinjojen UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT pluripotenssimarkkerigeenien läsnäolo, kun ne kasvoivat KSR-mediumissa, jossa oli R&D Systemsin ja PeproTechin valmistamaa FGF:ä.

UTA.05404.CPVT		
Primaarivasta-aine	R&D Systems	PeproTech
Nanog	Todella heikko (ei kuvaa)	Todella heikko (ei kuvaa)
Oct	Kyllä	Kyllä
Tra-1-60	Haalea	Kyllä
Tra-1-81	Haalea	Kyllä
SSEA-4	Ei	Ei
Sox-2	Haalea	Kyllä
UTA.07001.CPVT		
Nanog	Todella heikko (ei kuvaa)	Todella heikko (ei kuvaa)
Oct	Kyllä	Kyllä
Tra-1-60	Haalea	Haalea
Tra-1-81	Haalea	Haalea
SSEA-4	Ei	Ei
Sox-2	Kyllä	Haalea



KUVA 15. Solulinjan UTA.05404.CPVT immunovärjäyskuvat, kun ne kasvoivat KSR-mediumissa, jossa oli R&D Systemsin ja PeproTechin valmistamaa FGF:ä. Solulinjaa tarkasteltiin solujakonumeron ollessa viisi. Pluripotenssimarkkerigeeni on kuvissa A-B Oct, kuvissa C-D Tra-1-60, kuvissa E-F Tra-1-81 ja kuvissa G-H Sox-2. Kuvat A-H on otettu 10-kertaisella suurennoksella.



KUVA 16. Solulinjan UTA.07001.CPVT immunovärjäyskuvat, kun ne kasvoivat KSR-mediumissa, jossa oli R&D Systemsin ja PeproTechin valmistamaa FGF:ä. Solulinjaa tarkasteltiin, kun sen solujakonumero oli viisi. Pluripotenssimarkkerigeeni on kuvissa A-B Oct, kuvissa C-D Tra-1-60, kuvissa E-F Tra-1-81 ja kuvissa G-H Sox-2. Kuvat A-D ja F-H on otettu 10-kertaisella suurennoksella ja kuva E on otettu 20-kertaisella suurennoksella.

POHDINTA

Hiiren alkion fibroblastisolut

Kun tarkasteltiin iPS-solulinjojen morfologisia tuloksia niiden kasvaessa Milliporeen valmistamien MEF-solujen kanssa, havaittiin kaivoissa kasvavan paljon erilaistuneita solukolonioita. Täten MEF-solut eivät kyenneet ylläpitämään iPS-solulinjojen erilaistumattomuutta. Lisäksi testauksien yhteydessä havaittiin myös, että MEF-solujen kunnossa oli eroja, kun MEF-solutuotteiden eränumerot olivat erilaiset. Tuotteen laadun vaihtelevuus vaikutti olennaisesti solulinjojen viljelemiseen, kun toisilla MEF-soluilla soluviljelmiin ei kasvanut erilaistunutta kasvustoa ja toisiin viljelmiin kasvoi paljon erilaistunutta solukasvustoa. Tuotteen laadun vaihtelevuus vaikuttaa soluviljelytehokkuuteen.

Kun tarkasteltiin solulinjojen morfologisia tuloksia niiden kasvaessa Amsbion ja Cellsystemsin valmistamien MEF-solujen kanssa, soluviljelmissä kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. iPS-solulinjojen kasvaessa Cellsystemsin MEF-solujen kanssa, iPS-solulinjat kasvoivat hyvin, sillä soluviljelmät kasvoivat viikon päästä lähes konfluenttiin tilaan. Kun iPS-solulinjat kasvoivat Amsbion valmistamien MEF-solujen kanssa, soluviljelmät eivät olleet niin konfluentissa tilassa viikon kasvun jälkeen kuin Cellsystemsin MEF-solujen kanssa kasvaessaan. Lisäksi, kun iPS-solulinjoja jaettiin niiden kasvaessa Amsbion MEF-solujen kanssa, merkittävä haitta oli se, että MEF-soluja oli erittäin vaikea irroittaa kaivojen pohjasta, jolloin MEF-soluja jäi kaivoihin. Tämä hidasti merkittävästi työntekoa. iPS-solulinjoja jaettaessa niiden kasvaessa Cellsystemsin valmistamien MEF-solujen kanssa, MEF-solut irtosivat erittäin helposti kaivojen pohjasta ottamatta kolonioita mukaansa.

Kun iPS-solulinjat kasvoivat eri valmistajien MEF-solujen kanssa, iPS-solulinjojen immunovärjäystuloksista havaittiin, että solulinjat ilmentivät kaikkia muita pluripotenssimarkkerigeenejä (oct, tra-1-60, tra-1-81 ja sox-2) paitsi nanog ja SSEA-4 pluripotenssimarkkerigeenejä. Syyn arvellaan johtuvan immunovärjäysreagensseista eikä siitä, että solulinjat eivät olisi enää olleet pluripotentteja. Kun iPS-solulinjoja kasvatettiin Amsbion valmistamien MEF-solujen kanssa, iPS-solulinjat eivät

ilmentäneet myöskään sox-2:sta. Kuitenkin koko kasvatuksen ajan solulinjojen koloniat ilmentivät iPS-soluille ominaista morfologiaa. Tulisi tehdä enemmän testuksia, jotta voitaisiin sanoa, etteivät solulinjat olleet enää pluripotentteja. Kun solulinjat kasvoivat Milliporeen valmistamien MEF-solujen kanssa, ne ilmentivät heikosti eri pluripotenssimarkkerigeenejä. Kun solulinjat kasvoivat Cellsystemsillä valmistamien MEF-solujen kanssa, pluripotenssimarkkerigeenit ilmenivät hyvin selkeästi. Jotta voitaisiin varmasti sanoa MEF-solujen ylläpitäneen iPS-solulinjojen pluripotenttisuutta, tulisi suorittaa uudet immunovärjäykset ja selvittää, mikä immunovärjäysreagensseissa oli vialla.

Koska eri valmistajien MEF-solut kasvatettiin samoissa viljelyolosuhteissa ja samoilla viljelytekniikoille, eivät viljelyolosuhteet ja kasvatuksessa käytetyt viljelytekniikat ole voineet vaikuttaa saatuihin tuloksiin. Erot eri valmistajien MEF-soluissa voivat siten johtua valmistajien tavasta käsitellä soluja tai kuljetuksen aikana sattuneista tapahtumista.

Ennen kuin MEF-solut voivat ehkäistä soluviljelmässä kasvavien solujen erilaistumista, tulee ne olla inaktivoituja. Testattavien MEF-solujen valmistajat ovat itse inaktivoineet MEF-solut. Jos inaktivoiminen ei ole täysin onnistunut, eivät solut voi ylläpitää iPS-solulinjojen erilaistumattomuutta. Testauksissa huomattiin, että Cellsystemsillä MEF-solut jakautuivat eniten, mutta iPS-solut olivat vähiten erilaistuneita. Kuitenkin saatuihin laskutuloksiin vaikutti olennaisesti samassa tutkittavassa kaivossa jakautuvat iPS-solut, joten saadut tulokset ovat vain suuntaa antavia. Jotta saataisiin tietää vaikuttaako jakautuvien MEF-solujen määrä olennaisesti sen kanssa kasvaviin iPS-solujen erilaistumiseen, tulisi tehdä uusitutkimus. Katso Jatkotutkimukset s. 62.

Kaikista parhaiten iPS-solulinjojen pluripotenttisuutta ja erilaistumattomuutta kykeni ylläpitämään Cellsystemsillä MEF-solut ja kaikista huonoiten Milliporeen MEF-solut. Milliporeen MEF-solujen kunto vaihteli eränumeroiden mukaan. Valmistajat sanoivat syyn johtuvan kuljetuksen aikana sattuneista virheistä. Kuljetuksen aikana sattuneet virheet, kuten solujen sulaminen on voinut vaikuttaa olennaisesti solujen kuntoon, sillä solut eivät saisi sulaa kuljetuksen aikana. Solut kuljetetaan jäätyneinä, jotta ne eivät tulisi toimintakykyisiksi matkan aikana. Jos solut sulavat ja muuttuvat toimintakykyisiksi, niillä ei ole oikeaa kasvuympäristöä, jossa ne kykenisivät toimimaan

kunnolla. Kun solut kuljetuksen jälkeen siirretään takaisin nestetyppeen säilytykseen, ne jäätyvät uudelleen, jolloin solut kärsivät uudelleenjäädystä. Jos pakastusampulliin, jossa solut ovat, on päässyt muodostumaan vettä, vesi voi rikkoa solujen rakennetta jäätymisen yhteydessä. Matkan aikana tapahtunut MEF-solujen sulaminen voi siis olennaisesti vaikuttaa MEF-solujen kuntoon ja niiden kykyyn ylläpitää iPS-solulinjojen pluripotenttisuutta ja erilaistumattomuutta.

Saatujen tulosten perusteella MEF-solut vaikuttavat merkittävästi soluviljelyyn. Eri valmistajien MEF-soluissa oli paljon eroja. Parhaiten soluviljelyä tehostivat Cellsystemsin valmistamat MEF-solut, koska niiden kanssa kasvaneet iPS-solulinjat kasvoivat hyvin, kaivoissa kasvoi hyvin vähän erilaistunutta solukasvustoa ja MEF-solut saatiin irroitettu helposti. Cellsystemsin valmistamat MEF-solut ovat kuitenkin muiden valmistajien tuotteisiin verrattuna kaikista kalleimmat. Se ei kuitenkaan vaikuta sydäntutkimusyksikön hankintapäätökseen, koska sen valmistamalla MEF-soluilla saatiin aikaan kaikista parhaimmat soluviljelytulokset.

Mitomysiini C

MEF-solut, jotka kasvoivat kuoppalevyn kaivoilla, eivät olleet kärsineet paljoa Sigman mitomysiini C käsittelystä. Kuitenkin soluja kasvoi kaivoilla vähiten muihin verrattuna. Siihen on voinut vaikuttaa virheet pipetoitaessa tai itse mitomysiini C on vähentänyt elinkykyisten MEF-solujen määrää. On kuitenkin todennäköisempää, että on sattunut pipetointivirhe tai laskuvirhe, koska kasvaneet MEF-solut olivat muuten hyvännäköisiä. Lisäksi mitomysiini C käsittely inaktivoi hyvin MEF-soluja, koska jakautuvia MEF-soluja oli hyvin vähän. Myös Tocriksen mitomysiini C inaktivoi hyvin MEF-soluja. MEF-solut olivat kärsineet kaikista eniten Santa Cruzin mitomysiini käsittelystä, koska solut olivat alusta alkaen hyvin haaroittuneita. Lisäksi jakautuvia MEF-soluja oli kaikista eniten, joka kertoo osaltaan sen, ettei inaktivointi ollut ollut niin tehokas.

Saatujen tulosten perusteella eri valmistajien mitomysiini C:llä on eroja, jotka vaikuttavat olennaisesti MEF-solujen kuntoon. Kun MEF-solut käsiteltiin Tocriksen valmistamalla mitomysiini C:llä, MEF-solut eivät kärsineet käsittelystä niin paljoa kuin mitä Santa Cruzin mitomysiini C käsittelyn jälkeen. iPS-solut eivät kärsineet myöskään

Kun testattiin eri valmistajien mitomysiini C:n vaikutusta MEF-soluihin, kasvatettiin eri valmistajien mitomysiini C:llä käsitellyt MEF-solut samoilla kuoppalevyillä. Tällöin vallitsevat soluviljelyolosuhteet olivat kaikille samanlaiset. Lisäksi jokaista kuoppalevyn kaivolla kasvavia MEF-soluja käsiteltiin samoilla soluviljelytekniikoilla. Tämän vuoksi soluviljelyolosuhteet ja käytetyt soluviljelytekniikat eivät ole voineet vaikuttaa saatuihin kasvatustuloksiin. Tuotteiden laatuun ei ole myöskään voinut vaikuttaa niiden ylläpidossa käytetyt säilytysolosuhteet, koska tuotteita säilytettiin siten, miten jokaisen tuotteen tuoteselosteessa oli neuvottu.

Jokaista valmistajan mitomysiini C –tuotetta oli erilainen käsitellä. Kaikista helpoin oli käsitellä Tocriksen valmistamaa mitomysiini C:tä, jonka sulattaminen oli kaikista helpointa. Santa Cruzin valmistama mitomysiini C sulii aika helposti. Vaikein käsiteltävä oli Sigman valmistama mitomysiini C, jonka sulatus kesti kaikista kauiten. Sigman valmistama mitomysiini C ei meinannut kunnolla sulaa ja liueta tasaiseksi liuokseksi. Kuitenkin, vaikka Santa Cruzin valmistama mitomysiini C sulii helposti, jakautuvia MEF-soluja oli kaivoilla enemmän kuin Sigman tuotteella käsitellyissä kaivoissa. Tuotteen sulamisominaisuus ei ole siten voinut vaikuttaa saatuihin tuloksiin.

Eri valmistajien mitomysiini C käsittely vaikutti MEF-solujen kuntoon. Erot eri valmistajien mitomysiini C -tuotteissa voivat johtua niiden valmistustavoista. Jokainen valmistaja tuottaa mitomysiini C:n itse. Tällöin valmistustavat vaikuttavat itse tuotteeseen, jolloin eri valmistajien mitomysiini C – tuotteet ovat erilaiset. Koska tuotteet ovat erilaiset, tuotteiden vaikutukset MEF-soluihin ovat erilaiset.

Sigman mitomysiini C käsittelystä. Tocriksen ja Sigman mitomysiini C oli vaikuttanut hyvin MEF-solujen kykyyn jakautua, joka on mitomysiini C:n tehtävä (Tocris 2012, 1; Sigma-Aldrich 2008, 1). Tulosten perusteella Sigman ja Tocriksen valmistamat mitomysiini C tuotteet ovat molemmat hyviä vaihtoehtoja MEF-solujen inaktivoimiseen. Tocriksen valmistama mitomysiini C on Sigman tuotteeseen nähden halvempi.

Fibroblasti-kasvutekijä

Kun solulinjoja UTA.05404.CPVT ja UTA.07001.CPVT kasvatettiin R&D Systemsin valmistaman FGF:n kanssa, kaivoissa oli havaittavissa paljon erilaistunutta ja rosoista solukasvustoa. Tämä kertoo, ettei FGF ole kyennyt ylläpitämään iPS-solulinjojen erilaistumattomuutta kunnolla. Kun iPS-solulinjoja kasvatettiin PeproTechin valmistaman FGF:n kanssa, koloniat olivat sileitä ja tasaisia, joiden joukossa kasvoi vähän erilaistunutta solukasvustoa. FGF kykeni ylläpitämään siten hyvin iPS-solulinjojen erilaistumattomuutta. Kun tarkasteltiin solulinjojen immunovärjäyskuvia, kun ne kasvoivat molemmissa FGF-olosuhteissa, havaittiin, että molemmat solulinjat ilmentivät muita pluripotenssimarkkerigeenejä (oct, tra-1-60, tra-1-81 ja sox-2) paitsi nanogia ja SSEA-4:sta. Syyn arvellaan kuitenkin johtuvan immunovärjäysreagensseista eikä siitä, että solulinjat eivät olisi olleet pluripotentteja.

Kun tutkittiin eri valmistajien FGF-tuotteiden vaikutusta iPS-solulinjoihin, testaukset suoritettiin samanaikaisesti. Tällöin iPS-solulinjat kasvoivat samoissa viljelyolosuhteissa koko ajan. Lisäksi iPS-solulinjoja käsiteltiin samoilla soluviljelytekniikoilla. Soluviljelyolosuhteet ja käytetyt soluviljelytekniikat eivät ole siten voineet vaikuttaa saatuihin tuloksiin. Tuotteiden laatuun ei ole myöskään voinut vaikuttaa säilytysolosuhteet, koska tuotteita säilytettiin siten, miten tuotteiden valmistajat olivat tuoteselosteessa neuvoneet.

Eri valmistajien FGF-tuotteissa voi olla eroja, koska ne on tuotettu eri valmistajien toimesta. Tällöin tuotteet voivat poiketa toisistaan sisällöltään. Koska tuotteet ovat erilaiset, ovat tuotteiden vaikutukset iPS-solulinjoihin erilaiset.

PeproTechin valmistama FGF kykeni ylläpitämään hyvin iPS-solulinjojen erilaistumattomuutta. Kun iPS-solulinjat kasvoivat Milliporeen valmistamien huonompilaatuisten MEF-solujen kanssa, joiden eränumero oli 2007192 ja KSR-mediumissa oli R&D Systemsin valmistamaa FGF:ä, iPS-solulinjat olivat erilaistuneita. Kun KSR-mediumiin laitettiin PeproTechin valmistamaa FGF:ä ja muut olosuhteet pysyivät samanlaisina, iPS-solulinjat pysyivät hyvin erilaistumattomana. PeproTechin FGF ylläpitää siten voimakkaasti iPS-solulinjojen erilaistumattomuutta.

Saatujen tulosten perusteella eri valmistajien fibroblasti-kasvutekijä vaikuttaa olennaisesti soluviljelyyn. Parhaiten soluviljelyä tehosti PeproTechin valmistama FGF, koska se ylläpiti tehokkaimmin solulinjat erilaistumattomana ja solulinjat kykenivät kasvamaan konfluenttiin tilaan viikossa kolonnien pysyessä sileinä ja selvärajaisina. Lisäksi PeproTechin valmistama FGF on paljon halvempi kuin R&D Systemsin valmistama FGF.

Jatkotutkimukset

Kun testattiin eri valmistajien valmistamia inaktivoituja MEF-soluja, huomattiin jakautuvien MEF-solumäärien olevan järjestään yli 20 ja yli 200. Tuotteiden valmistajat olivat itse inaktivoineet MEF-solut. Kun taas tarkasteltiin jakautuvien MEF-solujen määrää, jossa MEF-solut oli inaktivoitu itse eri valmistajien valmistamilla mitomysiini C:llä, suurin jakautuva MEF-solu määrä oli 24. Valmistajien inaktivoimilla ja itse inaktivoituilla MEF-soluilla on siis suuri ero.

Jatkotutkimuksissa olisi hyvä testata valmistajien itse inaktivoituneet MEF-solut, jossa määritettäisiin, kuinka paljon jakautuvia MEF-soluja oikeasti on. Lisäksi tulisi tehdä tutkimus, jossa testattaisiin itse inaktivoituneiden MEF-solujen vaikutusta solulinjoihin soluviljelyssä. Näiden kahden testauksen avulla saataisiin tietää, vaikuttaako jakautuvien MEF-solujen määrä olennaisesti soluviljelyn tehokkuuteen. Lisäksi saataisiin tietää, onko itse inaktivoituneiden MEF-solujen ja eri valmistajien inaktivoimien MEF-solujen vaikutusten välillä eroja soluviljelyn tehokkuuteen.

LÄHTEET

Amit, M. & Itskovitz-Eldor, J. 2006. Feeder-free culture of human embryonic stem cells. NCBI 420, 37-49.

Amit, M., Shakariki, C., Marqulets, V. & Itskovitz-Eldor, J. 2003. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. NCBI 70(3), 837-845.

Christensen, N. & Winther, L. 2009. Multi-Staining Immunohistochemistry. 5. Painos. Teoksessa Kumar, G., Rudbeck, L., Robinson, P., Sturgis, J., Winther, H., Jensen, S., Müller, S., Matthiesen, S., Nielsen, K. & Henriksen, U. Immunohistochemical Staining Methods.

Conner, D. 2000. Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Feeder Cell Preparation. Teoksessa Current Protocols in Molecular Biology 2000. Wiley John & Sons, Inc.

Coriell Institute for Medical Research. 2011. What is Cell Culture. Tulostettu 19.09.2013. <http://www.coriell.org/research-services/cell-culture/what-is-cell-culture>

CytoSpring. ND. Mouse Embryonic Fibroblast. Product information. Tulostettu 07.11.2013. <http://www.cytospring.com/pages/MEF.pdf>

Fleischmann, G., Müller, T., Blasczyk, R., Sasaki, E. & Horn P.A. 2009. Growth characteristics of the nonhuman primate embryonic stem cell line cjes001 depending on feeder cell treatment. NCBI 11(2), 225-233.

Freshney, R. 2006. Basic Principles Of Cell Culture. Teoksessa Vunjak-Novakovic, G. & Freshney, R. 2006. Culture of Cells for Tissue Engineering. New Jersey: John Wiley & John, Inc.

Freshney, R. I. 2005. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. 5.painos. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Garfield, AS. 2010. Derivation of primary mouse embryonic fibroblast (PMEF) cultures. NCBI 633, 19-27.

Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B. & Daley, G. 2011. Induced Pluripotent stem cells – Opportunities for disease modeling and drug discovery. Nature Reviews 10, 915-929.

IHCWORLD. 2011. How to Choose the Best Secondary Antibody for Immunohistochemistry Application. Tulostettu 23.09.2013. http://www.ihcworld.com/_technical_tips/2nd_antibody_tips.htm

John Innes Centre. ND. Fluorescence microscopy. Tulostettu 06.11.2013. http://www.jic.ac.uk/microscopy/more/t5_6.htm

Karp, G. 2005. Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments. 4. painos. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

- Kausch, I., Lingnau, A., Endl, E., Sellmann, K., Deinert, I., Ratliff, T., Jocham, D., Sczakiel, G., Gerdes, J. & Böhle, A. 2003. Antisense treatment against ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Int. j. cancer* 105, 710–716.
- Minchiotti, G. Maintenance of mouse Embryonic Stem Cells in culture. ND. Tulostettu 19.09.2013.
http://www.sibbm.org/_files/protocols/mES_cells_maintenance_Minchiotti.pdf
- Mummery, C., Wilmut, I., van de Stolpe, A. & Roelen, B.A.J. 2011. *Stem Cells. Scientific Facts And Fiction*. 1. Paines. Elsevier Inc.
- Mummery, C., Zhang, j., S. Ng, E., Elliot, D., Elefanty, A. & Kamp, T. 2012. Differentiation of Human Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes. A Methods Overview. *Circulation Research* 111, 344-358.
- Noggle, S., Noboru, S. & Brivanlou, A. 2005. Feeder-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells. Teoksessa Bongso, A. & Lee, E.H. *Stem Cells. From Bench to Bedside*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 144-146.
- PeproTech. 2013. Recombinant Human FGF-basic. Tulostettu 07.10.2013.
http://www.peprotech.com/en-US/Pages/Product/Recombinant-Proteins/Growth-Factors-Cytokines/Recombinant_Human_FGF-basic/100-18B
- Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 42 (4), 405-426.
- Racaniello, V. 2010. Detecting viral proteins in infected cells or tissues by immunostaining. Luotu 30.09.2010. Tulostettu 06.11.2013.
<http://www.virology.ws/2010/09/30/detecting-viral-proteins-in-infected-cells-or-tissues-by-immunostaining/>
- R&D Systems. 2013. FGF basic. Products Sheet. Tulostettu 10.10.2013.
http://www.rndsystems.com/product_results.aspx?m=1430
- Rodolfa, K.T. 2008. Inducing pluripotency. Teoksessa Eggen, K & Daley, G. *StemBook* 2008. The Stem Cell Research Community.
- Roy, A., Krzykwa, E., Lemieux, R. & Neron, S. 2001. Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures. *NCBI* 10(6), 873-880.
- Sigma-Aldrich. 2013. Fibroblast Growth Factor-Basic human. Tulostettu 29.10.2013.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f0291?lang=fi®ion=FI>
- Sigma-Aldrich. 2008. Product Information Sheet. Mitomycin C. Luotu 01.08.2008. Tulostettu 10.10.2013.
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/m4287pis.Par.0001.File.tmp/m4287pis.pdf

Spring, K. & Davidson, M. 2013. Introduction to Fluorescence Microscopy. Nikon Microscopy U. Tulostettu 25.09.2013.
<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 1-3.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *NCBI* 131(5), 834-835;861-72.

Tampereen yliopisto/IBT/BioMediTech sydänryhmä. Työmenetelmät. Tulostettu 15.04.2013.

Thermo Scientific. 2013. Overview of Secondary Antibodies. Tulostettu 08.11.2013.
<http://www.pierce-antibodies.com/products/secondary-antibodies/>

Tocris. 2012. Product Information. Mitomycin C. Tulostettu 10.10.2013.
<http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=214936#.U15jVxCikeo>

Tohtori.2013. Trypsiini. Tulostettu 22.10.2013.
<http://www.tohtori.fi/?page=4069997&search=trypsiini>

U.S National Library of Medicine. 2013. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Tulostettu 07.11.2013. <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/catecholaminergic-polymorphic-ventricular-tachycardia>

van der Loos, C. 2009. User protocol for multi-color immunohistochemistry staining in intact tissue. USA: Cambridge Research & Instrumentation Inc.

Wang, J., Trowbridge, J.J., Rao, S. & Orkin, S.H. 2008. Proteomic Studies of Stem Cells. Teoksessa Bernstein, B & Lemischka, I. StemBook 2008, 1-15. The Stem Cell Research Community.

Yhtyneet Medix Laboratoriot. 2013. Trypsiini. fS-Tryps KL 2806. Päivitetty 09.10.2013. Tulostettu 22.10.2013.
<http://www.yml.fi/do.xsp?viewType=productview&redirect1=%2Fdo.xsp%3FobjectType%3Dproduct%26viewType%3Dlistview&objectType=product&directoryType=&productOID=493>

LIITTEET

Liite 1. Tuotteiden Valmistajat

Tuote	Valmistaja
Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG	Invitrogen
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgM	Invitrogen
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG	Life Technologies
BSA	Sigma
β -merkaptotetanoli	Life Technologies
DAPI	Vector Laboratories
FBS	PAA Laboratories
Glutamaks	Life Technologies
Kelatiini tyyppi A	Sigma
Ki-67	Millipore
KO-DMEM	Life Technologies
Kollagenaasi 4	Invitrogen
KO-SR	Life Technologies
NaH ₂ PO ₄	Sigma
Nanog	R&D Systems
NEAA	Lonza
NSD	Millipore
Oct	R&D Systems
PBS	Lonza
Pens/strep	Fisherscientific
PFA	Sigma
Sox-2	Santa Cruz
SSEA-4	Santa Cruz
Steriili vesi	Tamro
Tra-1-60	Millipore
Tra-1-81	Millipore
TritonX-100	Sigma

Liite 2. Testattavien reagenssien hintaerot

Hiiren embryonaaliset fibroblastisolut		
Valmistaja	Tuote määrä	Hinta
Millipore	5 milj. solua/ putki ja yhteensä 5 putkea	213 €, kun ostaa yli 10 putkea, saa -20 % alennuksen
Amsbio	4 milj. solua/putki ja yhteensä 5 putkea	210 €
Cellsystems	4 milj. solua/putki ja yhteensä 5 putkea	249 €

Mitomysiini C		
Valmistaja	Tuote määrä	Hinta
Sigma	2 mg	109 €
Santa Cruz	2 mg	36 €
Tocris	10 mg	126 €

Fibroblasti-kasvutekijä		
Valmistaja	Tuote määrä	Hinta
R&D Systems	25 µg	252 €
PeproTech	50 µg	148 €

Liite 3. Mediumien valmistusohjeet

MEF-medium	
KO-DMEM	44,5 ml
FBS	5 ml
Glutamax	0,5 ml

KSR-medium (20 % KO-SR KO-DMEM)	
KO-DMEM	38,75 ml
KO-SR	10 ml
NEAA	0,5 ml
Glutamaks	0,5 ml
Pen/Strep	0,25 ml
β -merkaptotaetanolii	98 μ l
FGF	26 μ l

Liite 4. Gelatiinin ja immunovärjäysliuosten valmistusohjeet

0,1 % Gelatiini	
Gelatiini A	0,5 g
H ₂ O	500 ml
50 °C:enVesihautaus puoli tuntia, jonka jälkeen liuos autoklaavataan	

4%PFA	
1	Kuumenna 900 ml vettä 60 °C:een kuumennuslevyllä. Työskentele vetokaapissa.
2	Lisää 40 g PFA-jauhoa kuumennettuun veteen. Veden tulee pysyä noin 60 °C:ssa 45 minuuttia.
3	Lisää muutama pisara 1 M NaOH, kunnes liuos kirkastuu.
4	Poista levyltä ja lisää 100 ml 10 % PBS:ä. Sovita pH 7,2 -7,4 käyttämällä 1 M NaOH tai HCl.
5	Suodata ja jaa eriin.
Säilytys	-20 °C:ssa

10 % BSA PBS:ssä, 20 ml	
BSA	2 g
PBS	20 ml
Liuota BSA lämpimässä vedessä PBS:än	
Säilytys	1 viikko + 4 °C:ssa

Blocking liuos: 10 % NSD, 0,1 % TritonX-100, 1 % BSA PBS:ssä, 10 ml	
4 % TritonX-100	250 µl
10 % BSA PBS:ssä	1 ml
NDS	1 ml
PBS	7,75 ml
Säilytys	1 viikko + 4 °C:ssa

Primaari Ab + pesuliuos: 1 % NSD, 0,1 % TritonX-100, 1 % BSA PBS:ssä, 20 ml	
4 % TritonX-100	0,5 ml
10 % BSA PBS:ssä	2 ml
NDS	200 µl
PBS	17,3 ml
Säilytys	1 viikko + 4 °C:ssa

Sekundaari Ab + pesuliuos: 1 % BSA PBS:ssä, 50 ml	
10 % BSA PBS:ssä	5 ml
PBS	45 ml
Säilytys	1 viikko + 4 °C:ssa

Fosfaatti puskuri, PB		
A Stokkiliuos	NaH ₂ PO ₄	27,6 g
	H ₂ O	1000 ml
B Stokkiliuos	NaH ₂ PO ₄	28,6 g
	H ₂ O	1000 ml

PB työliuos, 100 ml, 0,01 M pH 7,4	
A Stokkiliuos	1,15 ml
B Stokkiliuos	3,85 ml
H ₂ O	95 ml
Säilytys	1 viikko + 4 °C:ssa